

**T-Zell Rosettierung
mit Pyridyldisulfid-gekoppelten
monoklonalen Antikörpern
zur Unterdrückung
der Graft-versus-Host Reaktion
in der experimentellen
Knochenmarktransplantation**

Julius Fürfang

Disbui. München
1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546210_0058

T-Zell Rosettierung mit Pyridyldisulfid-gekoppelten
monoklonalen Antikörpern zur Unterdrückung der
Graft-versus-Host Reaktion in der
experimentellen Knochenmarktransplantation

Dissertation an der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

durchgeführt am Institut für Immunologie,
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München

Leiter: Prof. Dr. S. Thierfelder

vorgelegt von:

Julius Förfang

aus:

München

Oktober 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Schwarzfischer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Gutensohn

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Februar 1988

Aus aktuellem Anlaß wurden bereits Teile dieser Arbeit
veröffentlicht:

1. Förfang, J., Thierfelder, S.:

Effective avidin coating of erythrocytes by disulfide bond
formation.

J. Immunol. Methods 91 (1986) 123

2. Förfang, J., Thierfelder, S.

Rosetting of T cells with biotinylated antibodies and avidin
conjugated red cells for T cell depletion of bone marrow
(Abstract)

Exp. Hematol. 13/5 (1985) 429

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
PROBLEMSTELLUNG.....	1
A. ALLGEMEINE EINFÜHRUNG	
I. Geschichte der Knochenmarktransplantation.....	3
II. Die Sekundärkrankheit oder Graft versus-Host Disease (GvHD).....	8
III. Beeinflußung von Transplantationsreaktionen	
a) Strategie der Prophylaxe.....	10
b) Kombinierte Spender- und Empfängerbehandlung.....	10
1) Reziproke Interferenz.....	10
2) Ziele der Empfängerbehandlung.....	11
3) Ziele der in vitro Transplantatbehandlung.....	12
c) Behandlungsmethoden.....	12
1) Allgemein.....	12
2) Empfängervorbehandlung (Konditionierung).....	13
- Chemotherapie.....	13
- Ganzkörperbestrahlung (TBI).....	13
- Bakterielle Dekontamination.....	14
- Totale lymphoide Bestrahlung.....	14
- Antikörper und Antiseren.....	15
3) Transplantatbehandlung in vitro.....	15
3.1 Suppressionstechniken.....	15
3.2 Depletionstechniken (T-Zell Depletion).....	15
3.2.1 Physikalische Depletions-Methoden.....	16
3.2.2 Lectinagglutination.....	16
3.2.3 Immunologische Methoden.....	16
3.2.3.1 Depletion in der Flüssigphase.....	16
- Immunotoxine.....	16
- Komplementlyse.....	17
- Antikörperinkubation ohne Komplement.....	17
- Magnetische Antikörper.....	18
- Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (FACS).....	18

3.2.3.2 Träger-gebundene Depletion (Feste Matrices).....	18
- Panning.....	18
- Anti T-Zell Säulen.....	19
- Magnetische Partikel.....	19
- Rosetten.....	19
 B. ENTWICKLUNG EINES ROSETTIERUNGSVERFAHRENS ZUR SPEZIFISCHEN T-ZELL ELIMINIERUNG AUS ZELLGEMISCHEN	
 I. Einleitendes.....	21
 II. Prinzip der T-Zell Rosettierung mit monoklonalen Antikörpern.....	22
a) Direkte Rosettierung.....	22
b) Indirekte Avidin-Biotin Rosettierung.....	23
 III. Material und Methoden.....	24
a) Verwendete Salz- und Pufferlösungen.....	24
b) Tritiummarkierung von Avidin.....	26
c) Monoklonale Antikörper.....	26
1) Verwendete monoklonale Antikörper.....	26
2) Antikörperreinigung.....	26
α) Ammonsulfatpräzipitation.....	28
β) Gelfiltration.....	28
γ) Präparative Blockelektrophorese (PEVICON).....	29
3) Herstellung von Antikörperfragmenten.....	30
α) Divalente F(ab)' ₂ Fragmente.....	30
β) Monovalente F(ab)' Fragmente.....	31
4) Reinheitskontrolle.....	32
α) Immunelektrophorese.....	32
β) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	33
5) FITC-Markierung von Antikörpern.....	33
6) Biotinylierung von Antikörpern.....	34
d) Thymozytengewinnung.....	35
e) Indirekter Radioimmunoassay (RIA).....	35
f) Direkter und indirekter Immunfluoreszenztest.....	36

g) Schafererythrozyten (SRBC).....	38
1) Gewinnung.....	38
2) Glutaraldehyd-Fixierung.....	38
3) Beladung mit Avidin.....	38
α) Carbodiimid-Technik.....	38
β) Glutaraldehyd-Technik.....	39
γ) Chromchlorid-Technik.....	40
δ) Pyridyldisulfid-Technik.....	41
- Prinzip.....	41
- Einführung von Pyridyldisulfid-Gruppen.....	43
- Bestimmung des Substitutionsgrades.....	44
- Erzeugung von Sulfhydryl-Gruppen auf der Erythrozytenmembran.....	45
- Thiol-Disulfid-Austauschreaktion.....	45
ε) Avidindichte auf der Erythrozytenmembran.....	46
h) Quantitativer Rosettentest.....	46
i) Stabilitätstest für Rosetten.....	47
j) Analytische Zellseparation.....	48
IV. Ergebnisse.....	50
a) Kovalente Bindung von 2-Pyridyldisulfid-Gruppen an Erythrozyten.....	50
b) Kovalente Bindung von 2-Pyridyldisulfid-Gruppen an Avidin.....	52
c) Kovalente Bindung von 2-Pyridyldisulfid-Gruppen an Antikörper.....	52
d) Einfluß der SPDP-Modifikation auf das Bindungs- verhalten eines Antikörpers.....	53
e) Standardisierung der Antikörperbiotinylierung mit ³ H-Avidin.....	54
f) Herstellung Avidin-beladener Erythrozyten nach der Pyridyldisulfid-Technik.....	56
g) Indirekte T-Zell Rosettierung mit Avidin-beladenen Erythrozyten.....	58
1) Einfluß der Avidindichte auf die Rosettierung....	58
2) Vergleich verschiedener Avidinkopplungstechniken.	59
3) Vergleich verschiedener biotinylierter Antikörper.....	61
4) Hemmung der Rosettierung mit Biotin.....	61

h)	Herstellung Antikörper-beladener Erythrozyten nach der Pyridyldisulfid-Technik.....	61
i)	Direkte T-Zell Rosettierung mit Antikörper-beladenen Erythrozyten.....	62
j)	Analytische Zellseparation durch Avidin-Biotin Rosettierung.....	63
1)	Einfluß des Dichtegradienten auf Zellausbeute und Erythrozytenkontamination in der Interphase..	63
2)	Analytische Zelltrennungen mit Gradienten der Dichte 1,087 g/ml.....	64
k)	T-Zell Depletion aus Milz-Knochenmarkgemischen.....	65
V.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse von Teil B.....	67
C.	ANWENDUNG DER ROSETTIERUNGSTECHNIKEN ZUR UNTERDRÜCKUNG DER AKUTEN GvHD BEI KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION IM ALLOGENEN MAUSSYSTEM	
I.	Überblick.....	73
II.	Material und Methoden.....	74
a)	Versuchstiere.....	74
b)	Transplantationssystem.....	74
c)	Empfängerkonditionierung (Bestrahlung).....	74
d)	Transplantationstechnik.....	75
1)	Gewinnung von Milzzellen.....	75
2)	Gewinnung von Knochenmarkzellen.....	75
3)	Herstellung von Milz-Knochenmarkgemischen.....	76
4)	Milzmarktransplantation.....	76
e)	GvHD-Prophylaxe durch in vitro T-Zell Depletion.....	76
1)	Avidin-Biotin Rosettierung.....	76
2)	Direkte Rosettierung.....	77
3)	Komplement vermittelte T-Zell Lyse.....	77
f)	Testsysteme zur Beurteilung von GvH-Reaktionen.....	78
1)	Mortalitätstest (Mortalität, Gewichtsverlauf, klinische Symptome)...	78
2)	Histopathologische Beurteilung.....	78
3)	Nachweis des Spenderzellchimärismus.....	80
4)	Hauttransplantation.....	84

III. Ergebnisse.....	87
Gruppe A unbehandelte Kontrolle.....	87
Gruppe B Avidin-Biotin Rosettierung mit dem IgM-Anti- körper YTS 148.3.2.1.....	90
Gruppe C Suboptimale T-Zell Depletion.....	95
Gruppe D Antikörperbehandlung ohne Komplement.....	97
Gruppe E Komplementlyse mit YTS 148.3.2.1.....	97
Gruppe F Syngene Kontrolle.....	100
Gruppe G Direkte Rosettierung mit dem IgG2b-Antikörper RmT1.....	102
Gruppe H Komplementlyse mit RmT1.....	108
Gruppe I Strahlenkontrolle.....	110
Gruppe K Direkte Rosettierung und Komplementlyse mit RmT1 im reziproken CBA → CBL System.....	113
IV. Diskussion.....	116
V. Ausblick.....	138
D. ZUSAMMENFASSUNG.....	139
E. LITERATURVERZEICHNIS.....	145
F. DANKSAGUNG.....	159
G. PERSÖNLICHE DATEN.....	160

T-Zell Rosettierung mit Pyridyldisulfid-gekoppelten monoklonalen Antikörpern zur Unterdrückung der Graft-versus-Host Reaktion in der experimentellen Knochenmarktransplantation

PROBLEMSTELLUNG:

Knochenmarktransplantation wird in der Klinik seit etwa 15 Jahren mit wachsendem Erfolg zur Behandlung von verschiedenen Formen der Leukämie, Immundefekterkrankungen und genetisch bedingten Störungen der Blutbildung eingesetzt (1). Leider ist ihre Anwendung heute noch auf die Übertragung gewebeverträglichen (kompatiblen) Knochenmarks beschränkt. Unterscheiden sich nämlich Knochenmarkspender und -Empfänger hinsichtlich ihrer Histokompatibilitäts-Antigene, so kommt es nach Transplantation nicht nur zu einer klinisch zunehmend beherrschbaren Transplantatabstoßung durch den Empfänger (Host-versus-Graft Reaktion), sondern wegen der im Spendermark enthaltenen immunkompetenten T-Lymphozyten umgekehrt auch zu einer Reaktion der Spenderzellen gegen den Empfänger. Diese Graft-versus-Host Reaktion kann in ihrer akuten Form therapeutisch kaum beeinflusst werden und verläuft oft tödlich.

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß eine vorbeugende Entfernung der T-Lymphozyten aus dem Spendermark die Graft-versus-Host Reaktion verhindert und damit eine langfristige Toleranz der Spenderzellen gegenüber dem Empfängergerewebe erreicht werden kann. Es besteht somit Aussicht auf eine erfolgreiche Übertragung von unverträglichem, allogenen Knochenmark. Voraussetzung dafür ist allerdings, daß eine



Transplantatabstoßung durch entsprechende Konditionierung des Empfängers verhindert wird, und die blutbildenden Stammzellen des Spenders bei der T-Zell-Eliminierung geschont werden.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Entwicklung eines Rosettierungsverfahrens, das mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern eine möglichst wirkungsvolle T-Zell-Eliminierung im Transplantat ermöglichen soll. Dazu werden spezifisch gegen T-Lymphozyten gerichtete monoklonale Antikörper entweder direkt chemisch oder über eine Avidin-Biotin-Brücke an Schafererythrozyten gebunden. Die Schafererythrozyten ihrerseits binden dann bei einem Kontakt mit den entsprechenden T-Lymphozyten diese unter Bildung von Rosetten. Erythrozyten und Rosetten können anschließend im Dichtegradienten von den zu transplantierenden unrosettierten Zellen abgetrennt werden.

Die Effektivität der Rosettierungstechnik wird an künstlichen Gemischen von Mausthymozyten durch quantitative Rosettentests und durch analytische Zellseparation getestet und optimiert. Schließlich soll in Pilotstudien im Tiermodell "Maus" erprobt werden, inwieweit die erreichte T-Zell Depletion im Transplantat eine Graft-versus-Host Reaktion bei stark inkompatibler Spender-Empfänger-Konstellation beeinflusst. In einem Vergleich mit der Komplement vermittelten T-Zell Lyse sollen Vor- und Nachteile der entwickelten Rosettierungsmethode diskutiert werden.

Zum besseren Verständnis der bei der allogenen Knochenmarktransplantation auftretenden Probleme wird eine allgemeine

Einführung vorangestellt. Auf die geschichtliche Entwicklung der Knochenmarktransplantation, das Wesen der Sekundärkrankheit sowie die grundsätzlichen Möglichkeiten der Beeinflussung von Transplantationsreaktionen wird dabei näher eingegangen.

A. ALLGEMEINE EINFÜHRUNG

I. Zur Geschichte der Knochenmarktransplantation

Owen (2) beobachtete 1945, daß gelegentlich bei zweieiigen Zwillingssäubern, bei denen im Uterus eine Verbindung ihrer Blutkreisläufe bestand, eine gemischte Population ihrer genetisch unterschiedlichen Blutzellen anzutreffen ist. Diese Entdeckung zeigte zum ersten Mal, daß unter gewissen Bedingungen die Übertragung genetisch fremder Gewebe toleriert wird, anstatt eine Immunantwort auszulösen. Die Erzeugung spezifischer Toleranz anstatt Immunität wurde daraufhin zum erklärten Ziel aller Transplantations-Immunologen. Über erste erfolgreiche Knochenmarkübertragungen berichtete Lorenz (3) 1951. Letal bestrahlte Mäuse konnten durch intravenöse Injektion von Knochenmarkszellen anderer Mäuse am Leben gehalten werden. In der Folgezeit wurde klar, daß die transplantierten Zellen selbst (4) und nicht etwa humorale Faktoren für das Überleben der Tiere verantwortlich waren. Ford und Mitarbeiter (5) prägten den Begriff der "Strahlenchimäre". Sie zeigten durch zytogenetische Versuche mit Marker-Chromosomen, daß letal bestrahlte Empfängermäuse nach

Knochenmarktransplantation fast ausschließlich proliferationsfähige Knochenmarkszellen vom Spendertyp aufwiesen. Diese Spenderzellen waren anscheinend fähig, die durch Bestrahlung aplastisch gewordenen lymphatischen und blutbildenden Organe des Empfängers zu repopulieren und ein funktionstüchtiges lymphohämoetisches System vom Spendertyp aufzubauen. Durch die frühen Arbeiten von C.C. Little (6,7) auf dem Gebiet der Transplantationsgenetik standen für die Knochenmarktransplantation in zunehmendem Maße genetisch einheitliche Mäuse-Inzuchtstämme zur Verfügung und man erkannte, daß die genetischen Grundprinzipien der Tumortransplantation auch für die Knochenmarktransplantation zuträfen und daß Histokompatibilitätsgene bzw. ihre Genprodukte, die Histokompatibilitätsantigene, für das Anwachsen oder die Abstoßung eines Transplantats entscheidend waren. Es zeigte sich, daß bei Transplantationen zwischen genetisch stark unterschiedlichen Mäuse-Stämmen (allogene Transplantation) kein Überleben der Empfänger zu erreichen war, während zwischen den genetisch gleichen Individuen eines Inzuchtstammes (syngen) leicht und ohne Unverträglichkeitsreaktion transplantiert werden konnte (8,9,10).

Die Schwere der Transplantationsreaktionen nahm mit dem Grad der genetischen Verschiedenheit zwischen Spender und Empfänger zu. Der Grad der genetischen Verschiedenheit konnte durch die Entdeckung eines komplexen multiallelischen Systems von verschieden "starken" Histokompatibilitäts-Genloci (H-Loci) definiert werden, von denen der H-2 Genkomplex der Maus (11), der im menschlichen HLA-System (12) sein Äquiva-

lent besitzt, der wichtigste ist. Das Krankheitsbild, daß nach Transfer von allogenem Knochenmark auf letal bestrahlte Empfänger auftrat, wurde als allogenetische oder Sekundärkrankheit bezeichnet (8,13). Der Begriff Sekundärkrankheit soll dabei zum Ausdruck bringen, daß gegenüber der strahlungsbedingten Knochenmarksaplasie (Primärkrankheit), welche ohne Transplantation nach ca. 14 Tagen zum Tode führt, bei transplantierten Tieren eine verspätete, sekundäre Mortalität ab dem 21. Tag und zwar nach einer vorübergehenden Phase der Erholung auftritt.

In der Folgezeit erkannte man, daß die Ursachen der Sekundärkrankheit, wie von Barnes bereits 1954 vermutet, immunologischer Natur sind (14) und daß grundsätzlich eine Reaktion des Empfängers gegen den Spender (Host-versus-Graft Reaktion) und eine Reaktion der Spenderzellen gegen den Empfänger (Graft-versus-Host Reaktion) möglich ist (10,15). In Strahlenchimären ist die immunologische Kompetenz des Empfängers jedoch durch die Bestrahlung derart geschwächt, daß die Pathogenese der Sekundärkrankheit fast ausschließlich durch eine Graft-versus-Host Reaktion bedingt ist (16). Deshalb wurde die bei der allogenem Knochenmarktransplantation auftretende Sekundärkrankheit auch Graft-versus-Host Disease (GvHD) genannt, wobei aber eine mögliche Restreaktivität von Empfängerseite nicht übersehen werden sollte (17). Eine Verdeutschung der Graft-versus-Host Reaktion, z.B. Transplantat gegen Wirt Reaktion hat sich bisher nicht durchgesetzt. Durch Auswahl bestimmter Spender-Empfänger-Kombinationen, nämlich bei Transplantation von der Parentalgeneration auf

Empfänger der ersten Filialgeneration ($P \rightarrow F_1$), wo aus genetischen Gründen eine Reaktion des Empfängers gegen den Spender ausgeschlossen ist (18), konnten auch reine Graft-versus-Host Reaktionen untersucht werden.

Gowans (19) und Medawar (20) zeigten, daß reife immunkompetente Spenderlymphozyten die Sekundärkrankheit auslösen bzw. intensivieren konnten, und dokumentierten somit die zelluläre Basis von Transplantationsreaktionen. Durch Beimischen reifer Lymphknoten- oder Milzzellen zum Knochenmarkstransplantat wurde eine akute Form der Sekundärkrankheit (akute GvHD) hervorgerufen, die innerhalb von 6-8 Tagen nach Transplantation zum Tod der Empfänger führte.

Durch Transfer von Milz-Knochenmarkgemischen läßt sich die Anzahl immunkompetenter T-Zellen im Transplantat steigern und so können im Mäusemodell Verhältnisse simuliert werden, wie sie beim Menschen, Affen oder Hund anzutreffen sind. Hier sind durch Speziesunterschiede, aber auch durch die Entnahmetechnik bedingt, im Knochenmarksinokulum höhere Prozentsätze an immunkompetenten T-Zellen enthalten und somit werden akute Verläufe der Sekundärkrankheit häufiger beobachtet. Nachdem nun bekannt war, daß durch reife, postthymische T-Lymphozyten vom Spendertyp die Sekundärkrankheit ausgelöst und intensiviert werden konnte, wurde umgekehrt auch versucht durch möglichst spezifische Entfernung dieser T-Zellen aus dem Transplantat eine Graft-versus-Host Reaktion zu verhindern (21,22,23).

Physikalische Methoden zur T-Zellentfernung (21) brachten damals kaum eine Reduzierung von Transplantationsreaktionen.

Zur gleichen Zeit wurde versucht auf immunologischem Wege durch in vitro Inkubation des Spenderknochenmarks mit dem von Woodruff und Anderson 1963 entdeckten Antilymphozytenserum (ALS) die Sekundärkrankheit zu beeinflussen (24). Die Versuche scheiterten jedoch an der Kreuzreaktivität dieser Seren mit hämopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (25), wodurch trotz guter T-Zell Elimination ein Anwachsen des Spendermarks im Empfänger verhindert wurde. Die Überlebenschancen der Knochenmarksempfänger verbesserten sich jedoch zunehmend, als versucht wurde, diese Kreuzreaktivität durch Absorption an Lebergewebe oder Plasmazytomzellen zu eliminieren.

Erste Erfolge wurden auch mit polyklonalen Antiseren gegen das Theta-Antigen der Maus (26) erzielt (28,23). Kreuzreaktionen und mangelnde Standardisierbarkeit erschweren jedoch die Arbeit mit polyklonalen Antiseren. Heute können mit der von Köhler und Milstein 1975 entwickelten Hybridomtechnik (29) hochspezifische monoklonale Antikörper gegen beliebige T-Zellantigene produziert werden, welche mit wachsendem Erfolg zur Unterdrückung von Transplantationsreaktionen eingesetzt werden (30,31).

II. Die Sekundärkrankheit oder Graft-versus-Host Disease (GvHD)

Das Geschehen nach einer allogenen Knochenmarktransplantation wird beherrscht von der Konkurrenz zweier hämopoetischer Systeme um den im Empfänger zur Verfügung stehenden Raum. Entscheidend für den Ausgang einer genetisch nicht identischen Knochenmarksübertragung ist deshalb die Frage mit welcher Vehemenz GvH- und HvG-Reaktionen ablaufen und welches hämopoetische System sich am Ende durchsetzen kann. Bei gesunden unbehandelten Empfängern wird ein allogenes Transplantat innerhalb kurzer Zeit abgestoßen, da für die Spenderzellen kein Proliferationsraum zur Verfügung steht und der Empfänger ein funktionstüchtiges Immunsystem besitzt.

Ist ein Empfänger jedoch in seiner Immunkompetenz geschwächt, z.B. gleich nach der Geburt, nach immunsuppressiver Behandlung oder nach einer Ganzkörperbestrahlung und somit nicht in der Lage ein allogenes Transplantat abzustößen, dann kann das Vorhandensein von immunkompetenten T-Lymphozyten im Transplantat zu einer überschießenden zytotoxischen T-Zell Antwort der Spenderlymphozyten gegen die Histokompatibilitätsantigene des Empfängers führen. Diese primäre zytotoxische GvH-Reaktion ist mit der Freisetzung von Lymphokinen und -Toxinen verbunden, welche eine Fülle von Folgereaktionen auslösen, die schließlich zu einem Krankheitsbild führen, das wir Graft-versus-Host Disease, Sekundärkrankheit oder allogenetische Krankheit nennen. Äußere Symp-

tome sind Gewichtsverlust, Durchfall, Hautläsionen sowie eine fortschreitende Verschlechterung des Allgemeinzustandes (Wasting) bis hin zum Tode. Diesen Symptomen liegen zum Teil massive reversible und irreversible Gewebe- und Organschäden zu Grunde.

An der Pathogenese der GvHD können direkte Zytotoxizität, zelluläre und humorale Überempfindlichkeitsreaktionen, Antikörperdeposition im Gewebe, Autoimmunaggressionen, Entzündungen und Infektionen beteiligt sein, wobei oft Ursache und Wirkung nicht zu unterscheiden sind. Definitionsgemäß ist die GvHD eine Chimärenkrankheit (32) die nach Anwachsen des Spenderknochenmarks (Take) auftritt. Degenerative Effekte durch GvH- und HvG-Reaktionen werden überlagert von der Regeneration des neuen hämopoetischen Systems, was die Diagnose oft erschwert.

Klinisch und histologisch lassen sich 2 Verlaufsformen unterscheiden:

- 1) eine akute Form, welche meist innerhalb einer Woche nach Transplantation zum Tode führt und gekennzeichnet ist durch massive Infiltration verschiedener Organe und Gewebe mit aggressiven mononukleären Spenderzellen (Lymphozyten, Histiozyten)
- 2) eine verspätete, chronische Form, die je nach Spender-Empfängerinkompatibilität erst Wochen bis Monate nach Transplantation auftreten kann und nicht immer tödlich verläuft. Histopathologisch wird vor allem eine lymphoide Atrophie mit einer gestörten Repopulation lymphoider Organe beobachtet, die sich in einer erhöhten Infektanfälligkeit und gestörten Immunfunktionen äußert.

Welche der beiden Verlaufsformen auftritt hängt vom Grad der Gewebeverträglichkeit und von Anzahl und Herkunft der transplantierten Zellen ab. Auch Übergänge zwischen beiden Verlaufsformen sind möglich.

Transplantation bei MHC-Inkompatibilität mit hohem Anteil immunkompetenter T-Zellen begünstigt den akuten Verlauf. Dagegen läßt ein geringer T-Zell Gehalt im Transplantat oder Transplantation bei MHC-identischen Individuen (Minor Barriere) eher einen chronischen Verlauf erwarten.

Mit Ausnahme von gut definierten Tiermodellen läßt sich der tatsächliche Verlauf jedoch schwer voraussagen, da die heute mögliche Gewebetypisierung nicht alle Histokompatibilitätsantigene erfasst.

III. Beeinflussung von Transplantationsreaktionen

a) Strategie der Prophylaxe

Nachdem eine einmal ausgebrochene Sekundärkrankheit nur noch schwer zu beeinflussen ist, konzentrieren sich die Bemühungen heute darauf, durch vorbeugende Maßnahmen Immunreaktionen von Spender- oder Empfängerseite vor ihrer Manifestation zu unterdrücken. Erst wenn diese Strategie der Prophylaxe versagt, wird versucht, durch massive immunsuppressive Therapie den Verlauf der Krankheit zu mildern.

b) Kombinierte Spender- und Empfängerbehandlung

1) Reziproke Interferenz:

Die Schwierigkeiten der Präventivbehandlung liegen darin,

daß sich GvH- und HvG-Reaktion wechselseitig beeinflussen (33). Eine starke HvG-Reaktion hemmt die GvH-Reaktion; sie verhindert aber auch das dauerhafte Anwachsen des Transplantats. Andererseits führt eine GvH-Reaktion zu einer Verminderung der HvG-Reaktion und zu einer durchaus erwünschten Eliminierung restlicher Empfängerzellen im hämopoetischen System (34,35), was zu einem vollständigen Spenderzellchimerismus führt. Manche Autoren glauben, daß eine totale Unterdrückung der GvH-Reaktion zu einer Transplantatabstoßung führen kann, wenn nicht auch die HvG-Reaktion in gleichem Maße supprimiert wurde. Jede Behandlungsstrategie muß deshalb eine ausgewogene Kombination aus Spender (bzw. Transplantat)- und Empfängerbehandlung darstellen. Die Behandlung des Spenders mit Antiseren (24) oder durch Immunisierung mit Histokompatibilitätsantigenen des Empfängers (36) kommt für die klinische Anwendung aus ethischen Gründen nicht in Frage. So verbleiben für die Klinik neben der Auswahl kompatibler Spender noch zwei Möglichkeiten auf Transplantationsreaktionen präventiv einzuwirken: die Behandlung des Empfängers vor der Transplantation (Empfängerkonditionierung) und die in vitro Behandlung des entnommenen Knochenmarkstransplantats.

2) Ziele der Empfängerbehandlung

Ziele der Empfängerkonditionierung sind die Schaffung von Proliferationsraum für die Spenderhämoese durch Depletion von Zellen aus den lympho-hämopoetischen Organen des Empfängers sowie die Unterdrückung der HvG-Reaktion durch Aus-

schalten der immunkompetenten Empfängerlymphozyten. Eine erfolgreiche Empfängerkonditionierung resultiert in einem permanenten Spenderzellchimärismus.

3) Ziele der in vitro Transplantatbehandlung

Ziel der in vitro Transplantatbehandlung ist die Unterdrückung der GvH-Reaktion durch Ausschalten der immunkompetenten Spenderlymphozyten unter Schonung bzw. relativen Anreicherung der hämopoetischen Stammzellen. Eine erfolgreiche Transplantatbehandlung zeigt sich in einer Wiederbesiedlung der lymphatischen und hämopoetischen Organe des Empfängers mit Spenderzellen und dem raschen Aufbau einer spezifischen Toleranz gegen Empfängerantigene, bei Abwesenheit von GvH-typischen Symptomen.

c) Behandlungsmethoden

1) Allgemein

Zur Unterdrückung von Immunreaktionen werden zwei Wege beschritten: entweder man eliminiert die beteiligten immunkompetenten Zellen (Depletionstechniken) oder man versucht sie zu inaktivieren (Suppressionstechniken). Dabei sind spezifisch wirkende Techniken grundsätzlich weniger spezifischen Methoden vorzuziehen, welche unter Umständen den Aufbau einer funktionstüchtigen Hämoese beeinträchtigen. Spezifisch sind die immunologischen Behandlungsmethoden, deren Wirkung auf einer Antigen-Antikörperreaktion beruht.

Ein mehr oder weniger breites Wirkungsspektrum zeigen dagegen physikalische (Bestrahlung), oder chemotherapeutische (Zytostatika) Ansätze.

2) Empfängervorbehandlung (Konditionierung)

-Chemotherapie

Viele Versuche sind unternommen worden, um die ursprünglich zur Erzeugung von Strahlenchimären angewendete Ganzkörperbestrahlung durch andere, für den Empfänger weniger risikoreiche Methoden zu ersetzen. So können alkylierende Substanzen wie Cyclophosphamid oder Busulfan durch Hemmung der Zellteilung ähnliche Wirkungen zeigen wie ionisierende Strahlen und werden deshalb als Radiomimetika bezeichnet. Folsäureantagonisten (z.B. Methotrexat) oder Antimetabolite (z.B. Thioguanin) werden wegen ihrer zytostatischen Wirkung vor allem zur Eliminierung von Leukämiezellen eingesetzt. Um Wirkung auf die HvG-Reaktion zu zeigen, müssen diese relativ unspezifischen chemotherapeutischen Reagenzien aber in hohen Dosen eingesetzt werden, die zum Teil toxisch für bestimmte Empfängerorgane sind und ebenso auf die Spenderhäthropoese hemmend wirken.

-Ganzkörperbestrahlung (TBI)

Nach wie vor ist die Ganzkörperbestrahlung vor der Transplantation als Konditionierungsmittel anderen Methoden überlegen (37). Sie schafft Proliferationsraum, trifft bevorzugt das lymphohämoetische System und richtet sich sowohl gegen

immunkompetente Lymphozyten als auch gegen Leukämiezellen. Spenderzellen bleiben unbeeinflusst. Die maximal tolerierten Strahlendosen (37) für verschiedene Spezies sind bekannt, so daß das akute Risiko eines letalen Gastrointestinalsyndroms für den Empfänger gering ist. Ganzkörperbestrahlung wird deshalb heute in fast allen Behandlungsschemata angewendet. Im Maussystem genügt sie als alleiniges Konditionierungsmittel zur Erzeugung von Chimären.

-Bakterielle Dekontamination

Bei Empfängermäusen, die unter keimfreien Bedingungen gezogen wurden, tritt keine chronische GvH-Mortalität auf (41). Auch bei anderen Spezies führt die bakterielle Dekontamination vor allem des Magen-Darmkanals mit Antibiotika zu einer deutlichen Verminderung der chronischen GvH-Mortalität.

-Totale lymphoide Bestrahlung (TLI)

Slavin und Mitarbeiter (42) konnten zeigen, daß eine selektive Bestrahlung der lymphoiden Organe des Empfängers zu einem permanenten unvollständigen Chimärismus führt. Das Auftreten der chronischen Form der GvHD, nicht jedoch der akuten GvHD, konnte durch diese Maßnahme verhindert werden. Die TLI stellt somit für nicht maligne Erkrankungen eine interessante, für den Empfänger weniger bedrohliche Alternative zur Ganzkörperbestrahlung dar. Für eine endgültige Beurteilung reichen die bisherigen klinischen Ergebnisse aber noch nicht aus.

-Antikörper und Antiseren

Absorbierte Antilymphozytenserum (43), Anti-T-Zell Globuline (44) und bestimmte monoklonale Antikörper (45,46) wirken stark immunsuppressiv wenn sie dem Empfänger vor der Transplantation verabreicht werden. Sie unterdrücken sowohl GvH- als auch HvG-Reaktionen, so daß eine erfolgreiche GvHD Prophylaxe möglich erscheint, wenn alle T-Zell-Populationen erfasst werden und keine Stammzelltoxizität besteht.

3) Transplantatbehandlung in vitro

3.1 Suppressionstechniken

Von den wenigen, für die in vitro Transplantatbehandlung interessanten Suppressionstechniken erscheint ein Versuchsansatz von Tutschka erwähnenswert, der auf die Bildung spezifischer Suppressorzellen abzielt:

- Durch Inkubation von allogenem Spenderknochenmark mit Cyclosporin A (38,39,40) in Gegenwart von zellulären Empfängerantigenen konnte bei Ratten das Auftreten einer GvHD verhindert werden (47).

3.2 Depletionstechniken

Die Mehrzahl der in vitro Transplantat-Behandlungsmethoden befaßt sich mit der selektiven Abtrennung oder Eliminierung immunkompetenter T-Zellen (T-Zell Depletion) aus dem Transplantat:

3.2.1 Physikalische Depletions-Methoden

Physikalische Methoden wie Gegenstromzentrifugation (48) und Dichtegradientenseparation wurden in den letzten Jahren stark verbessert und zum Teil erfolgversprechend im Tiermodell und in der Klinik getestet (49,50).

3.2.2 Lectinagglutination

Die spezifische Bindung bestimmter Pflanzenlectine an Lymphozytensubpopulationen wird bei der Lectinagglutination ausgenutzt. Durch Trennung von agglutinierten und nicht agglutinierten Zellen im Transplantat gelang es Reisner (56) im allogenen Maus-Modell eine GvHD zu verhindern. In der Klinik dagegen konnten mit einer kombinierten Lectinseparation nur teilweise Erfolge erzielt werden (57,58).

3.2.3 Immunologische Methoden

Hier unterscheiden wir Träger-gebundene Depletionsmethoden, bei denen die Antikörper an feste Matrices gebunden sind, Antigen-tragende Zielzellen binden und dann mit der festen Phase abgetrennt werden und Depletionsmethoden, wo Antikörper oder Antikörperkonjugate in löslicher Form dem Transplantat zugegeben werden (Flüssigphase), um dort eine Depletion zu bewirken.

3.2.3.1 Depletion in der Flüssigphase

-Immunotoxine

Antikörperkonjugate mit Toxinen wie Ricin (51) reagieren mit den zu eliminierenden Zielzellen und töten diese. Die unspe-

zifische Aufnahme der Giftstoffe durch andere Zellen bereit-
tet inzwischen kaum noch Schwierigkeiten, so daß mit ersten
klinischen Pilotstudien begonnen wird (64).

-Komplementlyse

Bei der Komplement vermittelten T-Zell Lyse werden dem
Transplantat komplementbindende Antikörper in Form von
anti-Lymphozytenserum (53), anti-Thymozyten Globulin (54,
66), anti T-Zell Globulin (66,52), anti-Thetaserum (23)
anti-Vollserum (23) oder monoklonale anti T-Zell Antikörper
(30) zusammen mit Kaninchen- oder Meerschweinchenkomplement
zugegeben, wobei die Zielzellen in einer Komplement vermit-
telten zytotoxischen Reaktion getötet werden. Diese heute
wohl am meisten verwendete Methode der T-Zell Depletion ver-
hindert im Tiermodell nicht nur GvH-Reaktionen sondern auch
HvG-Reaktionen. Da Antikörper- und Komplementüberschüsse mit
dem Transplantat in den Empfänger gelangen, ist eine eindeu-
tige Abgrenzung der Wirkung auf den Empfänger bzw. Spender
meist nicht möglich. Probleme für die Klinik können sich
durch mangelnde Spezifität oder mangelnde Komplementbindung
der Antikörper und aus der Inkonzanz der Komplementquelle
ergeben.

-Antikörperinkubation ohne Komplement.

Ein anderer Weg ist die in vitro Inkubation des Transplan-
tats mit Antiseren oder monoklonalen Antikörpern ohne Kom-
plement, wobei auf funktionstüchtige empfängereigene Elim-
inationsmechanismen wie Komplementlysis, Opsonisation oder
Killermechanismen vertraut wird.

-Magnetische Antikörper

Durch Herstellung von Magnetitkolloiden mit Antikörpern können diese magnetisch gemacht werden und entsprechende Zielzellen über elektromagnetische Säulen abgetrennt werden (55). Die Methode erfordert hohe Magnetfelder von 10-70 Kilogaß und versagt bei niedriger Antigendichte auf der Zielzelle.

-Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (FACS)

Ausgezeichnete Zellseparationen lassen sich mit dem FACS erzielen, wobei sowohl die durch fluoreszierende Antikörper markierte Zielzellpopulation als auch die unmarkierte Zellpopulation mit hoher Reinheit zu gewinnen sind. Der Zellsorter eignet sich in der bisherigen Ausführung jedoch nicht für große Zellzahlen, wie sie für die klinische Knochenmarkstransplantation benötigt werden, da bei der Einzelzellanalyse maximal 2000-3000 Zellen pro Sekunde separiert werden können.

3.2.3.2 Träger-gebundene Depletion (Feste Matrices)

-Panning

Obwohl sich durch spezifische Adhärenz von T-Zellen an oberflächenbehandelte, antikörperbeladene Kunststoffplatten (Panning) gute T-Zell Depletionen erzielen lassen (59), reicht diese Methode in Sensitivität und Reproduzierbarkeit bisher nicht für eine klinische Anwendung aus.

-Anti T-Zell Säulen

Erfolgsversprechend ist die Immunadsorption von T-Zellen in anti T-Zell Säulen (60). Die anti T-Zell Antikörper sind hier an chemisch aktivierte Kunststoff- oder Sepharosepartikel gebunden und halten die vorbeiströmenden T-Zellen zurück. Im Säulendurchlauf ist die depletierte Restpopulation enthalten. Immunsäulen arbeiten reproduzierbar und sind leicht zu sterilisieren. Sie können aber durch spezifische und unspezifische Zellbindung verstopfen, so daß die depletierbare Zellzahl limitiert ist.

-Magnetische Partikel

Gute Zellseparationen lassen sich auch mit antikörperbeladenen magnetischen Kunststoffpartikeln erzielen (61). Sie sind zur Trennung großer Zellzahlen geeignet und Antigen-positive Zellen lassen sich nach Immunadsorption an die Magnetpartikel leicht durch permanente oder Elektromagnete abtrennen. Die magnetische Zellseparation wird derzeit für die klinische Anwendung in der allogenen und autologen Knochenmarktransplantation (62) getestet. Für eine breitere Anwendung wäre jedoch zu wünschen, daß entsprechende Magnetpartikel billiger kommerziell hergestellt werden.

-Rosetten

Antikörper-beladene Partikel bilden bei einem Kontakt mit Antigen-tragenden Zielzellen Aggregate, bei denen eine Zielzelle rosenförmig von den Trägerpartikeln umgeben ist (63). Diese Rosetten können in der Regel durch Dichtegradienten-

zentrifugation von der unrosettierten (Antigen-negativen) Zellpopulation abgetrennt werden. Wegen ihrer geringen unspezifischen Bindung werden vor allem Schaf- oder Rindererythrozyten zur Rosettierung verwendet, wobei Schaferythrozyten einen natürlichen Rezeptor für humane T-Lymphozyten besitzen. Durch Rosettierung lassen sich große Zellzahlen depletieren. Trotz sensitiver Rosettenbildung können Zellverluste und Sterilitätsprobleme bei der Dichtegradientenzentrifugation auftreten. Die T-Zell Rosettierung mit monoklonalen Antikörpern, mit der sich auch die vorliegende Arbeit befaßt, wurde bisher kaum im Tierversuch zur Beeinflussung der GvHD getestet. Erste klinische Versuche (Rieber, pers. Mitteilung) brachten unterschiedliche Erfolge, so daß ein Vergleich mit herkömmlichen Methoden im Tiermodell angebracht erscheint.

B. ENTWICKLUNG EINES ROSETTIERUNGSVERFAHRENS ZUR
SPEZIFISCHEN T-ZELL ELIMINIERUNG AUS ZELLGEMISCHEN.

I. Einleitendes

Von einer praktikablen Zelltrennungsmethode muß gefordert werden, daß sie in der Lage ist, eine große Zellzahl (10^9 - 10^{10}) rasch, schonend und mit hoher Trennschärfe zu separieren (67). Neben der sensitiven Erkennung und Bindung der Antigen-tragenden Zielzellen stellt die effektive Abtrennung der erkannten Zellen im Dichtegradienten bei der Immunrosettierung ein zusätzliches Problem dar. Trägergebundene Zelltrennungstechniken wie die Immunrosettierung zeigen Schwächen bei geringen Antigendichten auf der Zielzelle (67). Deshalb erlaubt der synergistische Einsatz mehrerer monoklonaler Antikörper (68) gegen verschiedene T-Zell Antigene eine vollständigere T-Zell Depletion im Knochenmarktransplantat als dies ein einzelner Antikörper vermag. Die hier entwickelte indirekte Avidin-Biotin Rosetten-technik ist im Gegensatz zu anderen Rosettierungstechniken so konzipiert, daß sie den synergistischen Einsatz biotinylierter Antikörper im Transplantationsmodell der Maus ermöglicht. Zur Bindung von Avidin auf Schaferythrozyten wird neben herkömmlichen Proteinkopplungstechniken erstmals die Pyridyldisulfidtechnik (69) angewendet. Auch bei der direkten Immunrosettierung (s.unten) wird diese effektive und schonende Methode zur kovalenten Kopplung monoklonaler Antikörper an die Erythrozytenmembran eingesetzt.

II. Prinzip der T-Zell Rosettierung mit monoklonalen Antikörpern

a) Direkte Rosettierung

Bei der direkten Rosettierung (Abb.1) wird der gereinigte monoklonale anti T-Zell Antikörper direkt chemisch auf die Erythrozytenoberfläche gebunden. Diese mit Antikörpern beladenen Erythrozyten gibt man in 10 bis 20fachem Überschuß zu einer Suspension der T-Zell-haltigen Probe. Durch leichtes Zentrifugieren bei 200facher Erdbeschleunigung wird der zur Antikörper-Antigenbindung erforderliche Zellkontakt hergestellt; es entstehen antigenspezifische Immunrosetten im Sediment.

Für analytische Zwecke wird nach 30-60 Minuten der Prozentsatz rosettierter Zellen in der Probe nach Zusatz eines Vitalfarbstoffes im Mikroskop bestimmt.

Soll eine T-Zell Depletion erfolgen, so können die leichteren unrosettierten Zellen im Dichtegradienten von den schwereren Erythrozyten und Rosetten abgetrennt werden.



Abb. 1 Direkte Rosettierung (schematische Darstellung)

b) Indirekte Avidin-Biotin Rosettierung

Bei der Avidin-Biotin Rosettierung (Abb. 2) wird die hohe Affinität ($k_D=10^{-15}M^{-1}$) des Eiklarproteins Avidin (MG=68000) zu Biotin ausgenutzt. Biotin ist auch unter dem Namen Vitamin H bekannt und kommt als prostetische Gruppe in zahlreichen carboxylierenden Enzymen der Leber vor (83). Zur Biotinylierung ist es als Succinimidester erhältlich.

Bei der zweistufigen Avidin-Biotin Rosettierung wird die T-Zell-haltige Probe im ersten Schritt mit einer ausreichenden Menge an biotinyliertem anti T-Tell Antikörper inkubiert und anschließend gewaschen. In einem zweiten Schritt folgt die eigentliche Rosettierung: Gibt man Avidin-beladene Schafererythrozyten in 10-20fachem Überschuß zu den mit biotinyliertem Antikörper besetzten T-Zellen, so bilden sich nach dem Zentrifugieren der Zellsuspension Rosetten.

Während bei der direkten Rosettierung der monoklonale Antikörper allein die Verbindung von T-Zellen und Erythrozyten bewerkstelligt, kommt bei der indirekten Avidin-Biotin Rosettierung eine Avidin-Biotin Brücke hinzu, wobei das Avidinmolekül vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin aufweist (70).

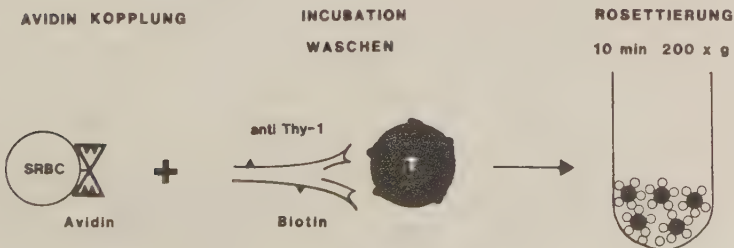


Abb. 2 Indirekte Rosettierung (schematische Darstellung)

III. Material und Methoden

a) verwendete Salz und Pufferlösungen

0,15 M Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS)

96 ml 0,2 M Na_2HPO_4 2 H_2O
+24 ml 0,2 M Na_2HPO_4 H_2O
+42,5 g NaCl mit H_2O dest auf 5 l auffüllen, pH mit HCl
oder NaOH korrigieren

Svendsen-Elektrophoresepuffer pH 8,8 (Ionenstärke 0,08)

65,0 g Na-Barbital
10,35 g Barbital ad 5 l H_2O lösen (Lösung 1)

281 g Glycin

225 g Tris ad 5 l H_2O lösen (Lösung 2)

Lösung 1 und Lösung 2 zu gleichen Teilen mischen und filtrieren.

Carbonatpuffer pH 9,0

Lösung 1= 1 M NaHCO_3

Lösung 2= 1 M Na_2CO_3

8 Teile Lösung 1 + 1 Teil Lösung 2 mischen und mit Lösung 1 oder 2 auf pH von 9,0 einstellen

Mischung 1:4 mit 0,14 M NaCl verdünnen und pH gegebenenfalls mit Lösung 1 oder 2 nachkorrigieren.

Physiologische Kochsalzlösung (NaCl) 0,9% in H_2O

(Braun, Melsungen)

Michaelis-Puffer für Immunelektrophorese

(Veronalpuffer pH 8,6, Ionenstärke 0,1)

20,6 g Natriumdiäthylbarbiturat

3,7 g Diäthylbarbitursäure mit H_2O dest auf 2 l

13,6 g Natriumazetat auffüllen

2 x SSC Citratpuffer

8,82 g Natriumcitrat mit H_2O dest auf 1 l

17,54 g NaCl auffüllen

Mc Illvain's Puffer pH 6,9 für Giemsa Färbung

3,52 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mit H_2O dest auf 1 l

3,40 g KH_2PO_4 auffüllen

b) Tritiummarkierung von Avidin

1 mCi N-succinimidyl (2,3-³H)propionat in Toluol (Amersham Buchler, Braunschweig, FRG) wird im Stickstoffstrom getrocknet und 2 mg Avidin (Sigma, St. Louis, USA) in 0,5 ml PBS zugeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h auf Eis gerührt und anschließend über eine Sephadex G25 Säule (1,6 cm x 30 cm) geschickt um das entstandene ³H-Avidin von Hydrolyseprodukten und ungebundener Radioaktivität abzutrennen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration im Photometer ($E_{280}=12,8$) kann die spezifische Aktivität berechnet werden. Sie ergab 23 mCi/ μ mol oder 266 000 CPM/ μ g ³H-Avidin. Die Kopplungseffektivität [(gebundene Radioaktivität/eingesetzte Radioaktivität) x 100] betrug 68%. ³H-Avidin kann nach Zusatz von 0,05% NaN₃ monatelang im Kühlschrank aufbewahrt werden.

c) Monoklonale Antikörper

1) In der Arbeit wurden 6 komplementbindende monoklonale Antikörper zur Biotinylierung und T-Zell Rosettierung verwendet, die in Tabelle I näher gekennzeichnet sind.

2) Antikörperreinigung

Mit Ausnahme des käuflichen Becton Dickinson Antikörpers mußten alle Antikörper aus Ascitesflüssigkeit gereinigt werden. Der Ratten-IgM anti-Thy-1 Ascites YTS 148.3.2.1 wurde freundlicherweise von Herrn Cobbold und Herrn Waldmann, Cambridge zur Verfügung gestellt, während die anderen Ascitiden von Herrn Kummer und Herrn Schuh aus den entsprechenden Hybridomlinien im Institut für Immunologie/GSF hergestellt wurden.

Tabelle I VERWENDETE MONOKLONALE ANTIKÖRPER

ANTIKÖRPER	HERKUNFT	SUBKLASSE	SPEZIFITÄT	C'BINDUNG	GVHD-UNTERDRÜCKUNG IN VIVO OHNE HETERO- LOGES KOMPLEMENT	Quelle
MRC Ox 7	Maus	IgG 1	Thy 1.1	ja	nein	Hunt&Williams, Oxford
HO-13-4	Maus	IgM	Thy 1.2	ja	nein	Marshak-Rothstein (ATCC No TIB 99)
BD No 1330	Ratte	IgG 2b	Thy 1.2	ja	ja	Becton Dickinson Belgien
YTS 148.3.2.1	Ratte	IgM	Thy 1	ja	nein	Cobbold&Waldmann, Cambridge
IFH-RmT4	Ratte	IgM	Thy 1	ja	nein	Kummer&Schuh, GSF, München
IFH-RmT1	Ratte	IgG 2b	Thy 1	ja	ja	Kummer&Schuh, GSF, München

α) Ammonsulfatpräzipitation

Die Ascitesflüssigkeit wird durch Ultrazentrifugation (1 h bei 120 000 xg) und Sterilfiltration grob von Fett und größeren Aggregaten befreit und mit der gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) verdünnt. Zu 55 Teilen dieser Verdünnung läßt man nun langsam unter Rühren 45 Teile einer in Wasser gesättigten Ammonsulfatlösung durch eine Spritzenkanüle zutropfen. In der Lösung wird dabei eine Ammoniumsulfatendkonzentration von 45% erreicht. Das Präzipitat wird abzentrifugiert (4000 xg) und 3x mit 45% Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Schließlich wird das Präzipitat in PBS aufgenommen und 2x gegen PBS oder Svendsen-Elektrophoresepuffer (72) dialysiert.

β) Gelfiltration

Auf Grund ihres hohen Molekulargewichtes (MG=900 000) lassen sich IgM Antikörper gut durch Gelfiltration von anderen Immunglobulinen trennen, so daß Ammonsulfatpräzipitation und anschließende Gelfiltration meist IgM von hoher Reinheit liefert. Aber auch IgG Antikörper können auf diese Weise von IgM Beimengungen gereinigt werden. Zur Gelfiltration wird eine Biogel A5m Säule (60 cm x 5 cm) nach Vorschrift des Herstellers (BioRad, München, FRG) gepackt und mit PBS äquilibriert. Anschließend werden maximal 5 ml der dialysierten Ammonsulfatfällung über eine Schlauchpumpe (40 ml/h) aufgetragen und mit PBS eluiert. Der IgM Gipfel erscheint nach ca 11 h und ist gut getrennt vom IgG Gipfel nach ca. 15 h. Die gereinigten Antikörper werden im Amicon Ultrafiltrationsgerät (Filter XM50) auf Konzentrationen um 5 mg/ml eingengt und tiefgefroren.

8) Präparative Blockelektrophorese (PEVICON)

Zur Isolierung von IgG Antikörpern aus Ascitesflüssigkeit wurde nach der Ammonsulfatfällung ein modifiziertes Verfahren der präparativen Blockelektrophorese nach Müller Eberhard (71) angewendet.

Dazu werden Pevicon (C870, Serva, Heidelberg, FRG) und Polyvinylchloridpartikel (PVC Nr 9163, Roth, Karlsruhe, FRG) zu gleichen Teilen w/w gemischt und 3x mit aqua dest gewaschen. Das Wasser wird über eine große Fritte abgesaugt und das Gemisch in wenig Svendsen Puffer zu einem dicken Brei angerührt. Der Brei wird in eine 1,2 cm x 48 cm x 24 cm große Plastikwanne gegossen, an deren Enden mit Svendsen-Puffer getränkte Tücher als Pufferbrücke eingebettet sind. Das Gel wird mit Plastikfolie abgedeckt und auf 4°C gekühlt. Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit mit Filterpapier wird die Oberfläche des Gels glattgezogen.

Die Ammonsulfat gefällte und gegen Svendsen-Puffer dialysierte Probe wird ultrazentrifugiert (1 h 100 000 xg) und mit einigen Körnchen Bromphenolblau (Biorad, München, FRG) versetzt. Die Farbstofffront wandert während der Elektrophorese mit der Albuminfraktion, und an ihrer Lage kann das Ende des Laufes abgelesen werden. Die Probe wird in eine quer zur Laufrichtung gezogene Kerbe in der Mitte des Gels aufgetragen. Die Plastikwanne mit dem Gel wird nun so zwischen zwei Elektrophoresekammern mit Svendsen-Puffer gestellt, daß die Pufferbrücken in die Pufferkammern tauchen, wo sich die Elektroden befinden.

Nach einer Äquilibrationszeit von 15 Min bei 4°C wird die Elektrophorese bei einem konstanten Strom von 50 mA mit einer Feldstärke von 6 V/cm gestartet. Nach Beendigung des Laufes wird das Gel in 2 cm breite Fraktionen geschnitten, von denen jede in einem 50 ml Falcon Röhrchen in 10 ml PBS aufgenommen wird. Nach Absetzen der Gelpartikel wird pro Fraktion ein Aliquot des Überstandes im indirekten Radioimmunoassay auf spezifische Antigenbindung ausgetestet. Die Fraktionen, die bindende Antikörper enthalten, werden vereinigt, über eine Fritte abgesaugt, eingeengt, gegen PBS dialysiert und ultrazentrifugiert. Nach Bestimmen der Proteinkonzentration im Photometer ($E_{280} = 14,3$) kann die Reinheit der Präparation durch Immunelektrophorese und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese festgestellt werden.

3) Herstellung von Antikörperfragmenten

Für bestimmte Fragestellungen wird die Wirkung der IgG Fragmente $F(ab)'_2$ und $F(ab)'$ mit der eines ungespaltenen Antikörpers verglichen.

α) Divalente $F(ab)'_2$ Fragmente

Divalente Antigen-bindende Fragmente ($F(ab)'_2$) werden durch Spaltung von IgG mit Pepsin (Boehringer, Mannheim, FRG) hergestellt. Dabei wird der Kohlenhydrat-tragende und für die Komplementbindung verantwortliche Fc-Teil abgespalten und in kleinere Bruchstücke zerlegt.

25 mg gereinigter IgG Antikörper in 3 ml PBS werden gegen 0,2 M Acetatpuffer pH 4,0 dialysiert. In einem 10 ml

Reaktionsgefäß werden dem Antikörper 0,5 mg Pepsin kristallin (2%) zugegeben und 36 h bei 37°C im Wasserbad gerührt. Anschließend wird das Spaltgemisch 2x gegen 5 l PBS dialysiert und über eine Sephacrylsäule S200 (90 x 2,2 cm) mit PBS als Laufmittel (30 ml/h) fraktioniert. Der $F(ab)'_2$ Gipfel erscheint nach ca. 4,6 h und läßt sich gut von den darauffolgenden $F(ab)'$, Fc Bruchstücken und kleineren Polypeptidstücken abtrennen. Eine Abtrennung von ungespaltenem IgG ist auf diese Weise nur schlecht möglich. Nach ca. 11,5 h ist der Lauf beendet. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde der Extinktionskoeffizient $E_{280} = 14,8$ von Hudson & Hay (73) benutzt.

β) Monovalente $F(ab)'$ Fragmente

Monovalente Antigen-bindende Fragmente ($F(ab)'$) wurden durch Reduktion von divalenten $F(ab)'_2$ mit 2-Mercaptoäthanol (Merck, Darmstadt, FRG) und anschließende Acetylierung mit Jodacetamid (Fluka, Neu Ulm, FRG) hergestellt.

1,2 mg gereinigte $F(ab)'_2$ Fragmente in 0,5 ml PBS werden mit 0,5 ml einer 20 mM 2-MercaptoäthanolLösung in PBS versetzt und 60 min bei Zimmertemperatur reagieren lassen. Danach werden zum Blockieren der entstandenen Sulfhydrylgruppen 100 µl 0,15 M Jodacetamid in PBS zugesetzt. Nach weiteren 15 min Inkubationszeit wird das Spaltgemisch zur Fraktionierung über eine Sephacryl S200 Säule (90 x 2,2 cm) geschickt (30 ml/h), die mit PBS äquilibriert war. Der $F(ab)'$ Gipfel erscheint nach ca. 5,6 h und der Lauf ist nach 13 h beendet. Zur Konzentrationsbestimmung im Photometer wurde der Extinktionskoeffizient $E_{278} = 15,3$ von Hudson & Hay (73) benutzt.

4) Reinheitskontrolle

α) Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde mit einer LKB 6800A Ausrüstung nach Vorschrift des Herstellers (LKB, Schweden) durchgeführt. Sie stellt eine Kombination von Agar-Gel-Elektrophorese und Immundiffusion dar und ermöglicht einen sensitiven Nachweis von Serumverunreinigungen in der Antikörperpräparation. Dazu werden saubere Objektträger in einem Plastikrahmen mit einer 1% gepufferten (1 g Agar/25 ml Michaelispuffer/ 75 ml H₂O) Agarlösung (Difco Special Agar Noble) beschichtet. Mit einer Stanze wird ein Muster aus langen schmalen Rinnen und Löchern in das Gel gestanzt. Mit einer Micropipette werden 2, μ l (10 mg/ml) der Probe in die Löcher gebracht und der Plastikrahmen in den Elektrophoreseapparat gelegt. Durch Puffer getränkte Rayondochte wird der elektrische Kontakt zwischen Gel und den darunter liegenden, mit Michaelis-Puffer gefüllten Elektrolytkammern hergestellt, in denen sich die Elektroden befinden. Bei einer Spannung von 200 V und 50 mA erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Antigene in der Probe innerhalb von 1,5 h. Mit einem Gelmesser werden die vorgestanzten Rinnen aus dem Gel gehoben und mit heterologem Antiserum gefüllt. In einer feuchten Kammer diffundieren nun die Antikörper des Antiserums gegen die Antigene der aufgetrennten Probe und bilden opalisierende Präzipitatbögen.

In der Regel werden die Präzipitatemuster nach Auswaschen der nicht präzipitierten Proteine (5 h in 1% NaCl, 1 h in H₂O) anschließend getrocknet und mit 0,6% Amidoschwarz in Waschlösung (100 ml Eisessig/350 ml Äthanol/550 ml H₂O) gefärbt. Nach Auswaschen des Farbstoffes in Waschlösung und Trocknen sind die blauschwarzen Präzipitatemuster besser zu erkennen als bei ungefärbten Präparaten.

β) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Elektrophoreseverfahren, bei der Proteine denaturiert und durch die polyanionische Substanz Sodiumdodecylsulfate (SDS) negativ aufgeladen werden. Im elektrischen Feld wird dadurch eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht erreicht. Verunreinigungen in Antikörperpräparationen mit abweichendem Molekulargewicht können so sensitiv nachgewiesen werden. Die SDS-PAGE wurde nach Vorschrift des Herstellers in einem BioRad Protean II Elektrophoresegerät durchgeführt. In der Regel wurden 10%ige Gele gegossen und mit einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (91) unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen gearbeitet.

5) FITC-Markierung von Antikörpern

Pro Milligramm des zu markierenden Antikörpers werden 0,05 mg des Fluoreszenzfarbstoffes Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) benötigt. Durchführung: 7 mg Antikörper in 1 ml PBS werden gegen Carbonatpuffer pH 9 dialysiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden 7 mg FITC Iso-

mer II (Sigma, St. Louis, USA) in 5 ml Carbonatpuffer gelöst und 250 µl davon der Antikörperlösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei 4°C lichtgeschützt gerührt und am nächsten Tag auf eine mit PBS äquilibrierte (15 ml/h) Sephadex G 25 Säule (0,9 cm x 12 cm) aufgetragen. Der FITC markierte Antikörper erscheint im Ausschlußvolumen nach ca. 12 min. Nach geeigneter Verdünnung in PBS kann das FITC zu Protein Verhältnis nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{FITC: Protein} = \frac{2,87 \times E_{495}}{E_{280} - 0,35 \times E_{495}} \quad (\text{Hudson\&Hay (73) S.12})$$

FITC markierte Antikörper werden in Plateausättigung eingesetzt, welche optisch im Fluoreszenzmikroskop oder besser im indirekten RIA bestimmt wird.

6) Biotinylierung von Antikörpern

Biotinmoleküle lassen sich nach einer modifizierten Methode von Heitzmann und Richards (74) über Biotinyl-N-hydroxysuccinimid (BNHS, Sigma, St. Louis, USA) leicht kovalent an freie Aminogruppen von Antikörpern binden. Dazu wird 1 Teil einer Lösung von BNHS (1-16 mg/ml) in Dimethylformamid (DMF, Merck, Darmstadt, FRG) mit 10 Teilen der Antikörperlösung (1-5 mg/ml) in PBS vermischt und 1,5 h bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 2x bei 4°C gegen PBS dialysiert. Ausmaß der Biotinylierung und Bindungsfähigkeit des Antikörpers konnten durch die Etablierung eines indirekten Radioimmunoassays mit ³H-Avidin als

zweiter Stufe bestimmt und standardisiert werden (siehe dazu Abb. 7, Seite 55). Antikörper wurden nach Möglichkeit bis zur Sättigung biotinyliert und Präparationen, die weniger als 1 Molekül ^3H -Avidin pro Antikörpermolekül zu binden vermochten, wurden verworfen.

d) Thymozytengewinnung

Eine junge Maus (4-6 Wochen) wird mit Äther getötet, in Rückenlage auf einem Korkbrett fixiert und die Bauchhöhle eröffnet. Um einen weitgehend erythrozytenfreien Thymus zu erhalten wird die Maus durch Anschneiden der großen Bauchgefäße entblutet. Anschließend wird der Brustkorb eröffnet, der ganze Thymus entnommen und in ein steriles Nygonsieb (Maschenweite 0,25 mm) überführt, welches in eine mit 5 ml Medium L15 (Serva, Heidelberg, FRG) gefüllte 10 cm Petrischale taucht. Mit dem Kolben einer 10 ml Plastikspritze wird der Thymus durch das Sieb passiert. Nach mehrmaliger Aspiration in der Plastikspritze wird die Thymozytensuspension zur Entfernung größerer Gewebeteile und Zellklumpen durch einen Schlinggazetupfer (Empfenzeder, München) gedrückt. Die so erhaltene Einzelzellsuspension wird 2 x mit Medium L15 gewaschen und zur Zellzahlbestimmung in der Neubauerkammer in ca. 5 ml des gewünschten Mediums aufgenommen.

e) Indirekter Radioimmunoassay (RIA)

Zur Austestung der Antigenbindung biotinylierter und unbiotinylierter monoklonaler anti Theta Antikörper wurde ein zweistufiges indirektes Nachweissystem auf Theta-haltigen Zielzellen (in der Regel Thymozyten) verwendet, wobei die

zweite Stufe mit Tritium radioaktiv markiert war. Der Test wurde in 96er Rundboden-Microtiterplatten aus Plastik (Greiner, Nürtingen) durchgeführt und läuft wie folgt ab: 370 000 Thymozyten in 20, μ l Waschlösung (PBS mit 2% FCS und 0,1% NaN_3) werden in den einzelnen Kavitäten der Microtiterplatte vorgelegt und mit je 10, μ l einer Verdünnungsreihe des Antikörpers in Waschlösung für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden anschließend mit 100, μ l kalter Waschlösung versetzt, zentrifugiert (280 x g, 5 min) und der Überstand durch Abklatschen entfernt. Dieser Waschvorgang wird 2x wiederholt wobei die pelletierten Zellen jeweils durch 1 min Schütteln auf einem Microtiterplattenschüttler (Flow Laboratories, Meckenheim, FRG) resuspendiert werden. Der zellgebundene Antikörper wird nun durch Zugabe von 10, μ l der Tritium markierten zweiten Stufe (^3H -anti Immunglobuline oder ^3H -Avidin für biotinylierte Antikörper) quantifiziert. Nach weiteren 30 min Inkubationszeit auf Eis und dreimaligem Waschen werden die Zellen in 100, μ l PBS resuspendiert und mit Hilfe eines 12-Kanal Zellharvesters (O. Hiller Co, Madison, WI, USA) auf Glasfaserfilter (Schleicher & Schüll, Nr. 6) übertragen. Die Filter werden getrocknet, in Szintillationsröhrchen mit 5 ml Rotiszint 1100 (Roth, Karlsruhe, FRG) überführt und im Packard Tri Carb 4000 Scintillationszähler ausgezählt.

f) Direkter und indirekter Immunfluoreszenztest

Zellständige Antigene können direkt durch fluoreszenzmarkierte Antikörper im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Zur Verhinderung von "Capping" Phänomenen (85) müssen alle Prozeduren bei 0-4°C ausgeführt werden.

Um eine Zellpopulation auf das Vorhandensein von T-Zellen zu prüfen, werden ca. 1×10^6 der fraglichen Zellen gewaschen und in einem 1,5 ml Eppendorfhütchen in 20 μ l PBS resuspendiert. Dazu werden 10 μ l einer entsprechenden Verdünnung des FITC-markierten anti-T-Zell Antikörpers gegeben und 30 min inkubiert. Nach 3 Waschzentrifugationen (200xg) mit je 1 ml PBS nimmt man die Probe in 50 μ l PBS auf. Die Zellen werden auf Objektträger mit Deckglas verbracht und in einem Zeiss Universalmikroskop mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung ausgewertet. Pro Ansatz werden mindestens 200 Zellen auf Antigen spezifische Fluoreszenz untersucht.

Die Anregung der grünen Fluoreszenz des FITC erfolgt selektiv mit Licht der Wellenlänge 490 nm, die Filterung des Emissionslichtes mit einem Interferenzsperrfilter für 520 nm. Der rote Fluoreszenzfarbstoff Tetramethyl-Rhodamin-Isiothiocyanat (TRITC) wird selektiv bei 546 nm angeregt und das Emissionslicht durch ein Kantenfilter von 590 nm dargestellt (75). Durch einen III/RS-Auflichtkondensor können die Zellen rasch hintereinander mit beiden Lichtkombinationen getestet werden, so daß auch Doppelmarkierungen auf ein und derselben Zelle mit zwei unterschiedlich markierten Antikörpern möglich sind. Bei Verwendung biotinylierter Antikörper ist ähnlich wie beim RIA ein indirekter Nachweis von Antikörper-besetzten Antigenen mit Avidin-FITC oder Avidin-TRITC als 2. Stufe möglich.

g) Schafererythrozyten (SRBC)

1) Gewinnung

Frisches Hammelblut wird durch Venenpunktion gewonnen und zur Stabilisierung und Gerinnungshemmung in Alsever's Lösung (Serva, Heidelberg, FRG) aufbewahrt. Vor Gebrauch werden die Schafererythrozyten 3x in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (500xg) und der Leukozytenüberstand abgesaugt.

2) Glutaraldehyd Fixierung

2 ml der gewaschenen und gepackten Schafererythrozyten werden in 44 ml kaltem PBS resuspendiert und durch Zutropfen von 2 ml einer frischen 2,5% Glutaraldehydlösung (Sigma, St. Louis, USA) in kaltem PBS fixiert (76). Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h auf dem Schüttler bei Zimmertemperatur wird die Suspension 3x in PBS gewaschen.

3) Beladung mit Avidin

4) Carbodiimid-Technik

Wasserlösliche Carbodiimide addieren Carbonsäuren unter Bildung eines O-acylierten Harnstoffmoleküls (87). Dieses reagiert leicht mit Nukleophilen. Mit Aminen (Proteinen) bildet sich ein Amid (Peptidbindung) wobei wieder ein disubstituierter Harnstoff abgespalten wird. Zur Avidinkopplung auf SRBC wurde die Methode von Goodfriend (77) modifiziert.

2×10^7 Glutaraldehyd-fixierte SRBC in 20 μ l NaCl werden mit 20 μ l einer Verdünnungsreihe von ^3H -Avidin in NaCl vermischt und 10 μ l einer 1%igen Lösung von 1-(3-Dimethylaminopropyl) -3-Äthylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDCI, Janssen, Beerse, Belgien) in NaCl zugegeben und 1 h unter leichtem Schütteln reagieren lassen.

Der pH-Wert liegt zwischen 7 und 5 und wird nicht korrigiert. Anschließend werden die Avidin beladenen Erythrozyten 3x in PBS gewaschen und im Szintillationszähler gemessen.

β) Glutaraldehyd-Technik

Glutaraldehyd (Sigma, St. Louis, USA) ist ein wasserlösliches bifunktionelles Kopplungsreagenz, welches häufig zur Kopplung von Proteinen auf Erythrozyten verwendet wird (76). Ein möglicher Reaktionsmechanismus wird bei Richards (86) aufgezeigt. In Anlehnung an die von Avrameas (76) beschriebene Einstufenreaktion werden 2×10^7 unfixierte SRBC in 20 μ l PBS mit 20 μ l einer Verdünnungsreihe von ^3H -Avidin in PBS vermischt und 10 μ l einer 0,5%-1,5% Glutaraldehydlösung in PBS zugegeben. Nach 2 h Inkubationszeit auf dem Schüttler werden die SRBC für 30 min in 0,1 M Glycin in PBS inkubiert, 3x mit PBS gewaschen und anschließend im Szintillationszähler gemessen.

8) Chromchlorid-Technik

Auf Grund ihrer besonderen Elektronenkonfiguration (81) können Cr^{3+} Ionen stabile Komplexe mit verschiedenen Liganden der spektrochemischen Reihe bilden. Diese Eigenschaft wird in der Immunologie ausgenutzt um Antikörper (79) oder Antigene (80) auf Erythrozyten zu koppeln. Zur Avidinbeladung von SRBC wurde im wesentlichen nach einer von Parish und McKenzie (82) beschriebenen Methode verfahren.

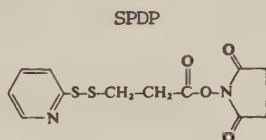
Aus einer l8igen, "gealterten" Stammlösung von $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, FRG) in NaCl, deren pH-Wert einmal vor-sichtig mit 1 n NaOH auf 5,0 titriert wurde, wird eine fri-sche 1:40 Verdünnung in NaCl hergestellt.

3×10^7 gewaschene unfixierte SRBC in 30,ul NaCl werden mit 20,ul einer Verdünnungsreihe von ^3H -Avidin in NaCl vermischt und unter Schütteln mit einer Hamilton Mikroliter-spritze 10,ul der CrCl_3 Verdünnung zugegeben, so daß eine CrCl_3 Endkonzentration von 0,0042% erreicht wird. Nach 5 min Reaktionszeit auf dem Schüttler werden die SRBC 3x mit reichlich PBS gewaschen (400xg) und im Szintilla-tionszähler gemessen. Da zu hohe CrCl_3 Konzentrationen zu einer unerwünschten Agglutination der Erythrozyten führen können, ist es ratsam, für größere Ansätze, die höchste nicht agglutinierende CrCl_3 Konzentration in kleinem Maß-stab auszutitrieren. Je nach zugegebener Proteinmenge waren CrCl_3 Endkonzentrationen zwischen 0,004% und 0,005% am besten.

6) Pyridyldisulfid-Technik

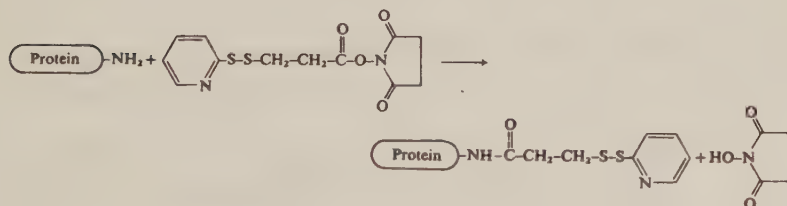
- Prinzip

Die Pyridyldisulfid-Technik (69) basiert auf der Verwendung des heterobifunktionalen Kopplungsreagens N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP, Pharmacia, Uppsala, Schweden).

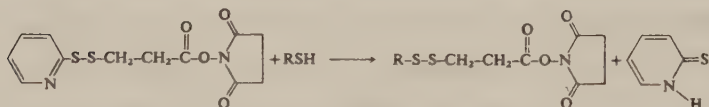


SPDP ist eine beidseitig aktivierte Propionsäure mit zwei unterschiedlich reaktiven funktionellen Gruppen:

Die N-succinimidyl-Gruppe ermöglicht eine nucleophile Substitution am Carboxylende (z.B. durch Aminogruppen), wobei N-Hydroxysuccinimid abgespalten wird. Mit Protein-Aminogruppen entsteht eine Peptidbindung.



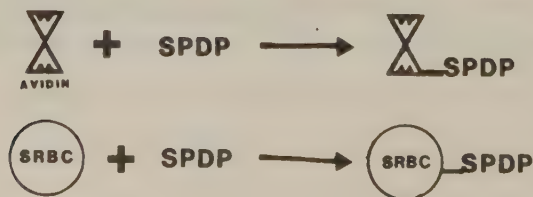
Die Pyridyldisulfidgruppe am aliphatischen Ende reagiert mit niedermolekularen Thiolen oder Protein-Sulphydrylresten, wobei unter Abspaltung von 2-Thiopyridon eine neue Disulfidbrücke geknüpft wird. (Thiol-Disulfid-Austauschreaktion)



Da 2-Thiopyridon im Gegensatz zur gebundenen Pyridyldisulfid-Gruppe ein Absorptionsmaximum bei 343 nm besitzt, läßt sich die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion quantitativ im Photometer verfolgen. Der molare Extinktionskoeffizient für 2-Thiopyridon beträgt:

$$e_{343} = 8,1 \times 10^3 \text{ (Liter} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}) \quad (84).$$

Die kovalente Verbindung von Erythrozyten und Avidin mit SPDP erfolgt stufenweise. Im ersten Schritt werden 2-Pyridyldisulfidgruppen mit Hilfe von SPDP in beide Reaktionspartner (Avidin und Erythrozyten) eingeführt.



In einem zweiten Schritt erfolgt die Reduktion der 2-Pyridyldisulfid-Gruppen auf der Erythrozytenoberfläche zu Sulfhydryl-Gruppen mit Dithiothreitol (DTT, Sigma, St. Louis, USA).



Vereinigt man nun die Sulfhydryl-Gruppen tragenden Erythrozyten mit dem SPDP modifizierten Avidin, so bilden sich in einer spontanen Thiol-Disulfid-Austauschreaktion stabile Disulfidbrücken.



- Einführung von Pyridyldisulfid-Gruppen

Zur Einführung von Pyridyldisulfid-Gruppen in Erythrozyten und Avidin wird eine frische 30 mM/l Lösung von SPDP in absolutem Äthanol hergestellt und unter N₂ Atmosphäre aufbewahrt. 1,5 ml dieser SPDP Lösung gibt man unter Schütteln zu 15 ml einer Suspension (1x10⁹/ml) von Glutaraldehydfixierten Erythrozyten in PBS. Nach 1 h Reaktionszeit werden die SRBC 3x mit PBS gewaschen und bis zur Reduktion mit DTT bei 4⁰C gelagert.

Gleichzeitig werden 70 µl der SPDP Lösung unter ständigem Rühren mit einer Lösung von 10 mg Avidin in 2 ml PBS vermischt. Nach 1,5 h bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch bei 4⁰C gegen reichlich PBS dialysiert. Durch Extinktionsmessung im Photometer bei einer Wellenlänge von

280 nm wird die Proteinkonzentration bestimmt und auf 1,2 mg/ml eingestellt. Da die eingeführten 2-Pyridyldisulfid-Gruppen zu einer Extinktionserhöhung führen, muß die Avidinkonzentration nach folgender Formel korrigiert werden:

$$(E_{280}^a - \text{Pyridon}^b \times 5100^c) \times 0,82^d = \text{Avidin}^e$$

(Mol/l) (mg/ml)

a = Extinktion des SPDP modifizierten Avidin bei 280 nm

b = Durch DTT-Reduktion freigesetztes 2-Thiopyridon; wird aus der Extinktionszunahme bei 343 nm bestimmt

c = Molare Extinktion von 2-Pyridyldisulfid-Gruppen bei 280 nm (69)

d = Avidin-spezifischer Umrechnungsfaktor zur Konzentrationsbestimmung bei 280 nm

e = Tatsächliche Avidinkonzentration

- Bestimmung des Substitutionsgrades

Die Anzahl der pro Avidinmolekül eingeführten 2-Pyridyldisulfid-Gruppen läßt sich durch Reduktion mit DTT bestimmen. Eine geeignete Verdünnung von SPDP-modifiziertem Avidin in 480, μ l PBS (mindestens 50, μ g) werden in einer Quarzküvette mit 20, μ l einer 50 mM/l DTT Lösung in PBS vermischt und die Extinktionszunahme durch das freigesetzte 2-Thiopyridon bei 343 nm gemessen.

Dividiert man den erhaltenen Extinktionswert durch den molaren Extinktionskoeffizienten für Thiopyridon ($8,1 \times 10^3 \text{ Liter} \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) so erhält man die Konzentration des gebildeten 2-Thiopyridon. Nach Multiplikation mit dem Endvolumen in der Küvette (0,5 ml) ergibt sich die absolute Menge des gebildeten 2-Thiopyridon. Setzt man nun diese absolute Menge des gebildeten 2-Thiopyridon ins Verhältnis zur absoluten Menge des eingesetzten SPDP-modifizierten Avidin (in 480 µl Küvetteninhalt), so ergibt sich der Substitutionsgrad (Mol 2-Pyridyldisulfid/Mol Avidin).

- Erzeugung von Sulfhydryl-Gruppen auf der Erythrozytenmembran $1,5 \times 10^{10}$ Pyridyldisulfid-Gruppen tragende SRBC werden abzentrifugiert und in 15 ml einer 50 mM/l DTT Lösung in PBS resuspendiert. Nach ca. 45 min ist die Reduktion abgeschlossen. Die Sulfhydryl-Gruppen tragenden SRBC werden 3x in entgastem PBS gewaschen und sofort mit dem SPDP modifizierten Avidin zur Reaktion gebracht.

- Thiol-Disulfid-Austauschreaktion

Ein Teil der frisch reduzierten SRBC ($2 \times 10^9/\text{ml}$) wird mit dem gleichen Volumen an SPDP modifiziertem Avidin (1,2 mg/ml) vermischt und über Nacht auf einem langsam rotierenden Mixer inkubiert. Die entstehenden Avidin beladenen Erythrozyten werden nach dreimaligem Waschen in Azid-haltigem Phosphatpuffer (PBS/0,1% NaN_3) bei 4°C aufbewahrt.

Die Anzahl der geknüpften Disulfidbindungen pro Erythrozyt kann durch Messung der Extinktion bei 343 nm im Überstand (84) abgeschätzt werden.

ε) Avidindichte auf der Erythrozytenmembran

- Qualitativer Test

Avidin-beladene SRBC werden 30 min lang mit einer ausreichenden Menge an biotinyliertem und zusätzlich FITC-markiertem MRC 0x7 anti Thy-1.1 Antikörper inkubiert und 3x gewaschen. Bei ausreichender Avidinbeladung zeigen die Erythrozyten eine deutliche Ringfluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop. Bei ungenügender Avidinbeladung ist diese Ringfluoreszenz unvollständig oder fehlt ganz.

- Quantitativer Test

Tritium-markiertes Avidin von bekannter spezifischer Aktivität ermöglicht die genaue Bestimmung der beim Kopplungsvorgang auf die Erythrozytenmembran gebundenen Avidinmenge. Sowohl die absolute Menge, als auch die Kopplungseffektivität konnte auf diese Weise für 3 verschiedene Einstufenkopplungsreaktionen bestimmt werden. Für die dreistufige Pyridyldisulfidtechnik wurde die Kopplungseffektivität photometrisch bestimmt und zwar durch einen Vergleich der Extinktionen bei 280 nm von eingesetztem Avidin und ungebundenem Avidin im Überstand.

h) Quantitativer Rosettentest

Ca. 1×10^6 Zellen der zu testenden Probe werden in einem 1,5 ml Eppendorfhütchen in 20 μ l PBS resuspendiert. Dazu

gibt man 10 μ l einer entsprechenden Verdünnung des biotinylierten monoklonalen anti-Thy 1 Antikörpers und inkubiert für 30 min bei 4 $^{\circ}$ C. Der Antikörper wird dabei im Überschuß gegeben (ca. 1 μ g/10 6 Zellen) so daß die Antigensättigung sichergestellt ist. Nach 3 Waschzentrifugationen (200xg) mit je 1 ml PBS wird die Probe in 150 μ l PBS aufgenommen, mit mindestens 1x10 7 Avidin-beladenen Erythrozyten vermischt und 10 min bei 200xg zentrifugiert. Nach einer Inkubationspause von 45 min bei 4 $^{\circ}$ C werden 20 μ l des vorsichtig resuspendierten Bodensatzes auf einen Objektträger verbracht und mit 2 μ l einer 1% Acridinorange-Lösung in NaCl vermischt. Nach Auflegen eines Deckglases wird der Prozentsatz von rosettierten zu nicht rosettierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Als Rosette wird dabei jede grün fluoreszierende Zelle gewertet, an der mindestens 3 Avidin-beladene Erythrozyten haften (siehe Abb. 3). Zur Kontrolle wird stets eine Parallelprobe im direkten oder indirekten Immunfluoreszenztest ausgewertet.

i) Stabilitätstest für Rosetten

Um die mechanische Stabilität der Avidin-Biotin Rosetten zu testen kann wieder der FITC-markierte und zusätzlich biotinylierte MRC Ox7 Antikörper benutzt werden: zunächst rosettiert man AKR Mausthymozyten quantitativ mit diesem Antikörper. Dann werden doppelmarkierte (Rosette $^{+}$ /FITC $^{+}$) Zellen und einfach markierte (Rosette $^{-}$ /FITC $^{+}$) Zellen bestimmt, und zwar vor und nach dem die Rosettensuspension bei mittlerer Geschwindigkeit auf einem Vortex Mixer geschüttelt wurde. Als stabil werden Rosetten in dieser Arbeit

bezeichnet, wenn der Anteil an freien Thymozyten (Rosette⁻/FITC⁺) nach der Vortexbehandlung 5% nicht übersteigt und wenn der Anteil an rosettierten Zellen vor der Vortexbehandlung dem Immunfluoreszenztest vergleichbare Werte ergibt.

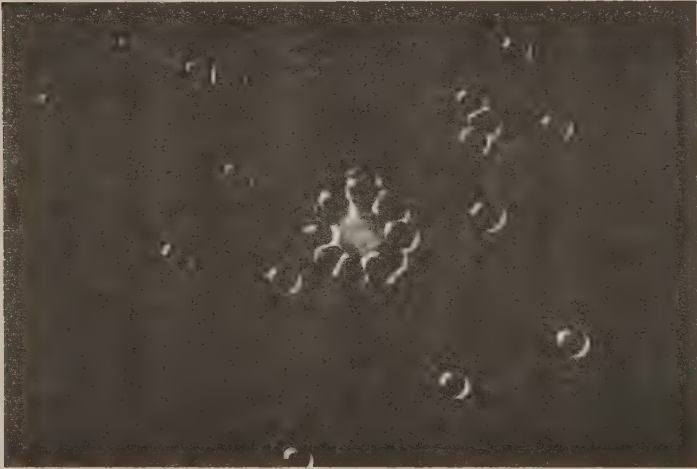


Abb. 3 Avidin-Biotin Rosette im Fluoreszenzmikroskop.

Die von Erythrozyten umgebene Zielzelle zeigt nach Acridinorange-Färbung grüne Fluoreszenz (ca. 1200x)

j) Analytische Zellseparation

Um die Selektivität der Avidin-Biotin Rosettierung in Bezug auf die T-Zell Depletion zu testen, habe ich analytische Zelltrennungen mit künstlich hergestellten Gemischen von Mausthymozyten durchgeführt.

Dazu werden 2×10^7 Zellen eines Gemisches aus 50% AKR Thymozyten vom Thy 1.1 Allotyp und 50% CBA Thymozyten vom Thy-1.2 Allotyp mit biotinyliertem MRC Ox7 anti Thy-1.1 abgesättigt, gewaschen und rosettiert wie beschrieben. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 4°C erfolgt die Zelltrennung in 12 x 75 mm Rundboden-Plastikröhrchen (Falcon Nr. 2058). Der Bodensatz wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette in 1 ml Hank'scher Lösung (Serva, Heidelberg, FRG) resuspendiert und über einen Percoll Gradienten (Pharmacia, Uppsala, Schweden) der Dichte 1,087 g/ml geschichtet. Zentrifugiert man die Röhrchen 12 min lang bei 1000xg und Zimmertemperatur, so erhält man die rosettierten AKR Zellen im Bodensatz und die negativen CBA Zellen als weißlichen Ring in der Interphase. In den Fraktionen wird anschließend sowohl die absolute Zellzahl als auch die relativen Anteile von CBA und AKR Zellen durch direkte Immunfluoreszenz mit anti Thy 1.1 FITC bzw. anti Thy 1.2-FITC bestimmt. Ein indirekter Immunfluoreszenztest mit Avidin-FITC erkennt AKR Zellen, die mit biotinyliertem MRC Ox7 beladen sind. Unspezifische Rosetten mit Thy-1.2 positiven Zellen können im Bodensatz als Thy-1.2-FITC⁺/Rosette⁺ oder als Avidin-FITC⁻/Rosette⁺ Zellen nachgewiesen werden.

Die T-Zell Depletion wird wie folgt berechnet:

$$\% \text{ T-Zell Depletion} = 100 \times \left[1 - \frac{\left(\begin{array}{c} \% \text{ positiv} \\ \text{nach Trennung} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{c} \text{Gesamtzellzahl} \\ \text{nach Trennung} \end{array} \right)}{\left(\begin{array}{c} \% \text{ positiv} \\ \text{vor Trennung} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{c} \text{Gesamtzellzahl} \\ \text{vor Trennung} \end{array} \right)} \right]$$

IV. Ergebnisse

a) Kovalente Bindung von 2-Pyridyldisulfid-Gruppen an Erythrozyten

Die Einführung von Pyridyldisulfid-Gruppen in die Erythrozytenmembran mit Hilfe von SPDP gelingt leicht mit einer Kopplungseffektivität von ca. 30% (Abb. 4 und 5). Die gekoppelte Menge an 2-Pyridyldisulfid-Gruppen ist über weite Konzentrationsbereiche proportional der eingesetzten Menge an SPDP.

Eine Sättigung der Erythrozyten wird bis hinauf zu 1×10^9 Pyridyldisulfid-Gruppen pro Erythrozyt nicht erreicht. Für die Kopplung von Antikörpern oder Avidin werden ca. 5×10^8 Pyridyldisulfid-Gruppen pro Erythrozyt eingeführt.

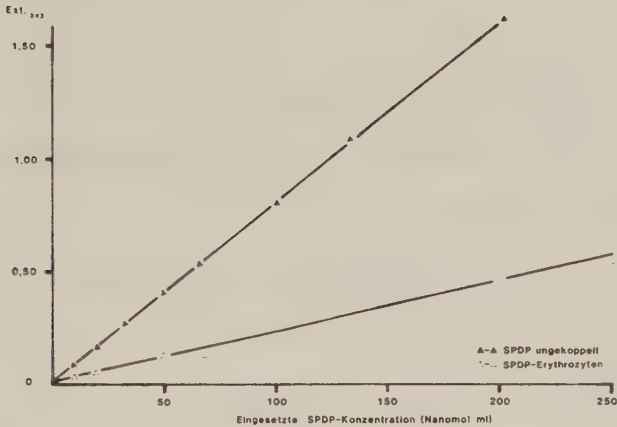


Abb. 4 Kovalente Bindung von 2-Pyridydisulfid Gruppen an Erythrozyten mit N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP)

Steigende Mengen SPDP wurden auf $1 \cdot 10^9$ Glutaraldehyd-fixierte Erythrozyten in 1 ml PBS gebunden und mit Dithiothreitol (DTT) im 20 fachen Überschuß reduziert. 1 Mol SPDP ergibt dabei 1 Mol 2-Thiopyridon ($\epsilon_{343} = 8.1 \cdot 10^3$). Reduziert man reines SPDP zum Vergleich (100% Wert), so läßt sich die Kopplungseffektivität aus der Extinktionsdifferenz bestimmen.

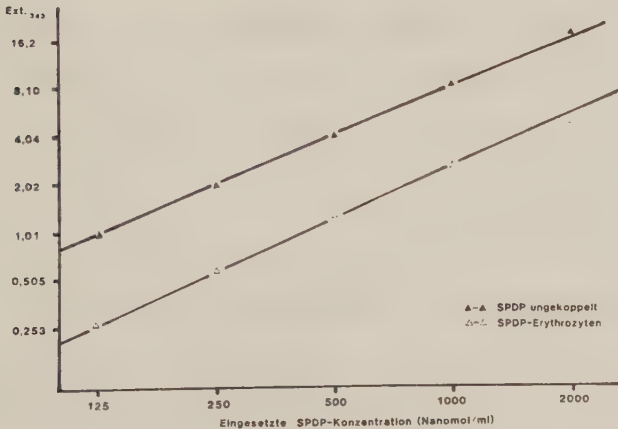


Abb. 5 Kovalente Bindung von 2-Pyridydisulfid Gruppen an Erythrozyten (logarithmischer Maßstab)

b) Kovalente Bindung von 2-Pyridyldisulfid-Gruppen an Avidin

Zur Avidinbindung an Erythrozyten können bis zu 13 Pyridyldisulfid-Gruppen auf dem Avidinmolekül erzeugt werden, ohne daß Präzipitation oder ein Verlust der Biotinbindungsfähigkeit auftritt (Tabelle II).

Die Effektivität dieses Schrittes liegt bei ca. 90%. Eine Sättigung mit Pyridyldisulfid-Gruppen wird bei einem Substitutionsgrad von 17 erreicht, wobei aber massive Präzipitation auftritt.

Tabelle II AVIDINMODIFIKATION MIT SPDP

Molarer Überschuß SPDP / Avidin MG 312 / MG 68000	Avidinverlust bei Dialyse u. Präzipitation	Avidineinsatz zur Reduktion korrigiert	2-Thiopyridon freigesetzt	Subst. Grad SPDP/Avidin	Kopplungs- effektivität	Präzipitation sichtbar
8,2 fach	25%	3,3 nMol	26 nMol	7,8	96%	-
12,2 fach	30%	3,1 nMol	37 nMol	11,8	96%	-
15,3 fach	36%	2,9 nMol	38 nMol	13,5	88%	+
18,4 fach	48%	2,3 nMol	37 nMol	16,3	88%	++
20,4 fach	50%	2,9 nMol	48 nMol	16,6	81%	+++

c) Kovalente Bindung von 2-Pyridyldisulfid-Gruppen an Antikörper

Für den monoklonalen IgG 1 Antikörper MRC Ox7 (MG=160 000) erwies sich eine Modifikation mit 20-30 fachem SPDP Überschuß als zweckmäßig für die direkte Rosettierung.

Der Substitutionsgrad des modifizierten MRC Ox7 beträgt dabei 7,2-7,4 und liegt nahe an der Sättigungsgrenze. Präzipitation trat bis zu einem 50fachen SPDP Überschuß nicht auf. Der monoklonale IgG 2b Antikörper RmT1 fällt dagegen bereits bei 20fachem molarem SPDP-Überschuß merklich aus, so daß zur direkten Rosettierung ein Konjugat mit dem Substitutionsgrad 5,0 verwendet wurde.

Die Kopplungseffektivität bei 10fachem SPDP Überschuß betrug 50%.

d) Einfluß der SPDP-Modifikation auf das Bindungsverhalten eines Antikörpers.

Ein Vergleich des Bindungsverhaltens von SPDP-modifiziertem und unbehandeltem MRC Ox7 auf AKR Thymozyten ist in Abb. 6 dargestellt (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus 3 Versuchen).

Es zeigte sich kein sichtbares Nachlassen der Antigenbindungsfunktion. Im Radioimmunoassay wurde ein nahezu gleicher Titer für die modifizierte (Substitutionsgrad 4) und für die nicht modifizierte Form des Antikörpers beobachtet. Auch bei maximaler Substitution war nur ein Titerabfall von höchstens 1 Titerstufe festzustellen. Das höhere Bindungsplateau des SPDP-modifizierten Antikörpers dürfte durch eine Reaktion freier SH-Gruppen im polyklonalen ^3H -Ziege-anti-Maus Immunglobulin mit dem SPDP-modifizierten Primärantikörper bedingt sein.

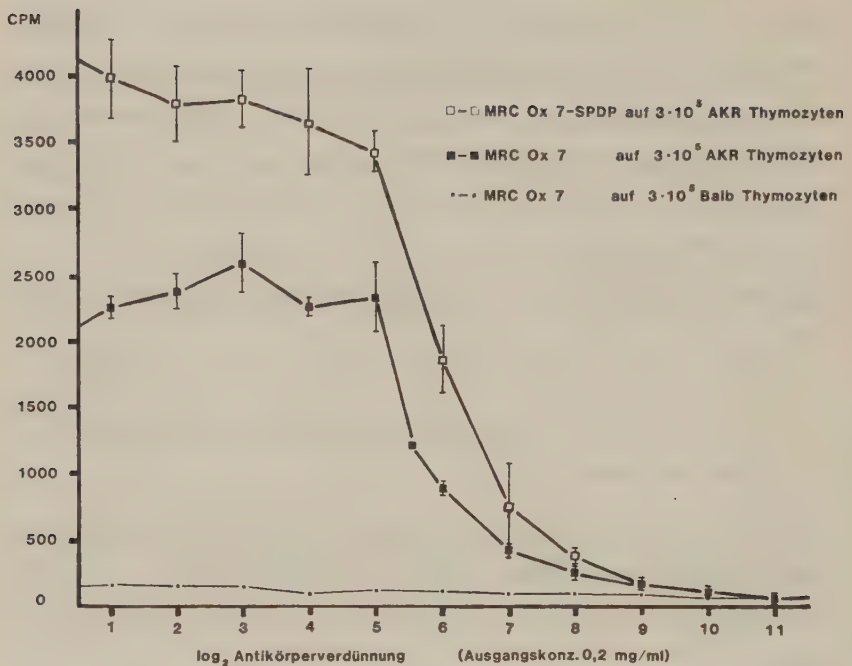


Abb. 6 Vergleich im Antigenbindungsverhalten des SPDP-modifizierten und des unmodifizierten Antikörpers MRC Ox7 im indirekten Radioimmunoassay mit ^3H -Ziege-anti-Maus Immunglobulin als 2. Stufe

e) Standardisierung der Antikörperbiotinylierung mit ^3H -Avidin

Da sich monoklonale Antikörper je nach der Anzahl und Position von freien primären Aminogruppen unterschiedlich gut biotinylieren lassen, war eine Standardisierung der Biotinylierung wünschenswert. Durch die Einführung eines

indirekten Radioimmunoassays auf Thymozyten mit ^3H -Avidin als zweiter Stufe konnten sowohl das Ausmaß der Biotinylierung als auch die Antigenbindung des biotinylierten Antikörpers beurteilt werden. In Abb. 7 ist die Austestung verschiedener Biotinylierungsgrade des MRC Ox7 auf AKR-Thymozyten bei Antikörpersättigung beispielhaft dargestellt. Bei steigendem molaren Überschuß des Biotinsuccinimidesters über MRC Ox7 zur Biotinylierung ergibt sich erwartungsgemäß eine Sättigungskurve für die ^3H -Avidinbindung. Dabei werden mit Hilfe des ^3H -Avidin nicht alle auf dem Antikörper gebundenen Biotinmoleküle erfaßt, sondern nur die für Avidin tatsächlich sterisch zugänglichen.

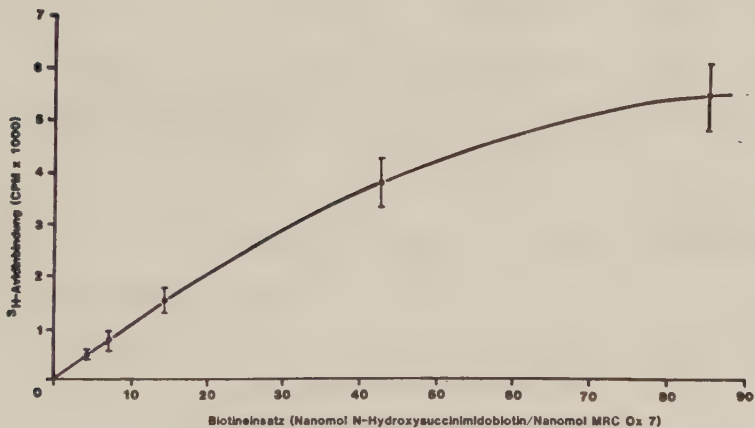


Abb. 7 Austestung verschiedener Biotinylierungsgrade des MRC Ox7 im indirekten Radioimmunoassay auf AKR Thymozyten bei Antikörpersättigung.

Mason und Williams (87) haben für den MRC Ox7 Antikörper eine Sättigungsdichte auf AKR Thymozyten von 3×10^5 Molekülen pro Zelle bestimmt, was gut mit eigenen Ergebnissen übereinstimmt. Legt man diesen Wert unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität des ^3H -Avidin (266 000 CPM/ μg Avidin) für weitere Berechnungen zugrunde, so läßt sich die Avidinbindung für verschiedene Biotinylierungsgrade des MRC Ox7 in Molekülen Avidin pro Antikörpermolekül ausdrücken.

Durch einen Vergleich anderer biotinylierter Antikörper mit dem MRC Ox7 in der ^3H -Avidinbindung war eine Standardisierung der Antikörperbiotinylierung möglich. Biotinkonjugate, die weniger als 1 Molekül ^3H -Avidin pro Antikörpermolekül zu binden vermochten wurden verworfen. Für Rosettierungsversuche wurden die Antikörper, wenn möglich bis zur Sättigung biotinyliert, wobei ein Antikörpermolekül bei 5fachem ^3H -Avidinüberschuß in der Regel 2-3 Avidinmoleküle binden konnte.

Die Antigenbindungsfähigkeit der Antikörper wurde durch die Biotinylierung ähnlich wie bei der SPDP-Modifikation (siehe Abb. 6) nur unwesentlich beeinflusst. Auch bei hohem Biotinylierungsgrad war im indirekten RIA ein Titerabfall von maximal einer log 2 Titerstufe zu beobachten.

f) Herstellung Avidin-beladener Erythrozyten nach der
Pyridyldisulfid-Technik

Die Reduktion von SPDP-modifizierten Erythrozyten mit 50 mM/l Dithiothreitol erfolgte rasch und quantitativ. Da

die entstehenden Sulfhydrylgruppen in PBS nicht lange stabil bleiben (88,89) sollte die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion möglichst bald nach der Reduktion der Erythrozyten durchgeführt werden. Restliche Sulfhydrylgruppen verlieren ihre Reaktivität bei Lagerung in PBS/0,1% Azid innerhalb weniger Tage durch Autoxydation.

Bei der Thiol-Disulfid-Austauschreaktion wurden 10%-90% des eingestetzten SPDP-modifizierten Avidins (Substitutionsgrad 13) gebunden, wobei pro Avidinmolekül mehrere (2-3) Disulfidbrücken geknüpft wurden. Die Kopplungseffektivität der mehrstufigen Pyridyldisulfid-Technik war damit bei vergleichbarem Avidineinsatz deutlich höher als bei herkömmlichen Einstufenkopplungsreaktionen (vergleiche Tabelle III und IV).

Tabelle III

SENSITIVITÄT UND STABILITÄT DER T-ZELL ROSETTIERUNG NACH
AVIDINKOPPLUNG MIT DER PYRIDYLDISULFID-TECHNIK

Zum Thiol reduzierte Schafererythrozyten wurden mit steigenden Mengen von SPDP-modifiziertem Avidin beladen und im funktionellen Rosettentest getestet

Kopplungstechnik	Avidineinsatz (Moleküle/SRBC)	Kopplungs- effizienz	Rosetten ^a (%)	IF ^b (%)	stabile Rosetten
Pyridyldisulfid	$1,0 \cdot 10^7$	>10%	97	98	+
	$5,0 \cdot 10^6$		97	98	+
	$2,5 \cdot 10^6$		97	97	+
	$1,3 \cdot 10^6$		95	98	+
	$3,0 \cdot 10^5$		86	98	-

a % Rosetten mit AKR Thymozyten, die mit biotinyliertem MRC Ox 7 inkubiert waren

b % Immunfluoreszenz positive AKR Thymozyten, die mit direkt FITC-markiertem MRC Ox 7 separat inkubiert wurden

x Molekulargewicht von Avidin: 68000

Tabelle IV

VERGLEICH VERSCHIEDENER EINSTUFEN-KOPPLUNGSREAGENZIIEN IN DER AVIDINKOPPLUNG AUF ERYTHROZYTEN

SRBC wurden mit Hilfe von herkömmlichen Einstufen-Proteinkopplungstechniken mit zunehmenden Mengen ^3H -Avidin beladen. $1 \cdot 10^6$ SRBC wurden gewaschen und mit einem 12-Kanal Zellharvester auf Glasfaserfilter (Schleicher+Schuell No 6) übertragen. Die getrockneten Filter wurden in Szintillationsröhrchen mit 5 ml Rotisint 1100 überführt und im Szintillationszähler ausgezählt. Die ^3H -Avidinbindung ist in Relation zur Anzahl und Stabilität der mit Mausthymozyten gebildeten Rosetten dargestellt.

Kopplungstechnik	^3H -Avidineinsatz (Moleküle/SRBC)	^3H -Avidin gebunden (Moleküle/SRBC)	Kopplungs- effizienz	Rosetten (%)	IF (%)	stabile Rosetten
Glutaraldehyd (Glut.)						
Glut. 10 mM/l	$5,3 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^3$	0,003%	34	98	-
Glut. 40 mM/l	$5,3 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^3$	0,011%	55	97	-
Carbodiimid (EDCI) ^a						
EDCI fix ^b	$8,0 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^4$	0,3%	64	98	-
EDCI fix ^b 10 mM/l	$2,6 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^4$	0,6%	48	97	-
EDCI fix ^b	$3,3 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^3$	1,1%	25	98	-
Chromchlorid						
CrCl ₃ unfix ^c	$3,8 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^4$	0,2%	93	98	+-
CrCl ₃ unfix ^c 0,16mM/l	$7,6 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^4$	0,3%	88	96	-
CrCl ₃ unfix ^c	$1,5 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^3$	0,4%	76	97	-
CrCl ₃ unfix ^c	$3,8 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^3$	0,8%	44	98	-

a EDCI : 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-Äthylcarbodiimid Hydrochlorid; (Aldrich,Belgien)

b Glutaraldehydbehandlung vor der Carbodiimidkopplung

c Keine Glutaraldehydbehandlung vor der Chromchloridkopplung

g) Indirekte T-Zell Rosettierung mit Avidin-beladenen Erythrozyten

1) Einfluß der Avidindichte auf die Rosettierung

Mit unterschiedlichen Mengen Avidin beladene Erythrozyten wurden im quantitativen Rosettentest auf ihre Funktion getestet und die Stabilität der gebildeten Rosetten im Rosetten-Stabilitätstest beurteilt. Wie aus Tabelle III und IV hervorgeht ist die Dichte der auf die Erythrozytenmembran gekoppelten Avidinmoleküle entscheidend für die Sensitivität des Rosettierungssystems und für die Stabilität der gebildeten Rosetten. Stabile Rosetten (Abb. 8) wurden erst

bei einer relativ hohen absoluten Menge an gebundenem Avidin pro Erythrozyt (ca. 1×10^5 Moleküle Avidin/Erythrozyt) erhalten. Wird dieser Grenzwert nicht erreicht, so sind die Rosettierungsergebnisse im funktionellen Rosettentest unreproduzierbar und im Vergleich zur direkten Immunfluoreszenz nicht quantitativ.

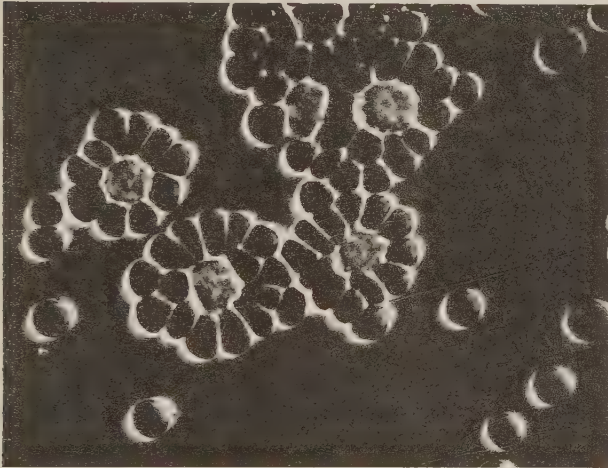


Abb. 8 Stabile und quantitative Rosettierung im funktionellen Rosettentest.

2) Vergleich verschiedener Avidinkopplungstechniken

Neben der mehrstufigen Pyridyldisulfid-Technik wurden drei herkömmliche Einstufenreaktionen zur quantitativen Avidinkopplung auf SRBC benutzt: Die Glutaraldehyd-Technik (76), die Carbodiimid-Technik (77) und die Chromchlorid-Technik (82). Die für eine stabile und quantitative Rosettierung

erforderliche minimale Avidindichte auf Schafererythrozyten wurde unter den beschriebenen Bedingungen nur mit der Chromchlorid- und mit der Pyridyldisulfidtechnik erreicht (Tabelle III und IV).

Mit der Chromchlorid-Methode wurde die geforderte Avidindichte nur knapp erreicht. Dementsprechend ergab sich eine schlechtere Reproduzierbarkeit und größere Streuung der Rosettierungsergebnisse. Der Rosetten-Mittelwert aus 10 Rosettierungen mit AKR Thymozyten und biotinyliertem MRC Ox7 ergab $91\% \pm 3\%$.

Die unspezifische Rosettierung mit unbiotinyliertem MRC Ox7 oder biotinyliertem nichtbindendem BD 1330 Antikörper lag bei ca. 3% .

Mit Hilfe der Pyridyldisulfid-Technik dagegen konnte leicht ein zehnfaches der erforderlichen Avidindichte auf der Erythrozytenmembran erzeugt werden, was in einer nahezu quantitativen Rosettierung und hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zum Ausdruck kam. Mit der Pyridyldisulfid-Technik betrug der Mittelwert aus 10 Rosettierungen unter standardisierten Bedingungen $96,6\% \pm 1,4\%$ und stimmte gut mit den parallel durchgeführten Immunfluoreszenzbestimmungen überein ($96\% \pm 0,8\%$).

Für die Standardkopplung wurde ein Avidineinsatz von 5×10^6 Molekülen pro Erythrozyt gewählt. Die unspezifische Rosettierung lag je nach Avidinbeladung zwischen 7% und $0,5\%$.

3) Vergleich verschiedener biotinylierter Antikörper

Andere biotinylierte Antikörper gegen das Thy-1 Antigen zeigten eine dem MRC Ox7 vergleichbare Sensitivität bei der Avidin-Biotin Rosettierung. Der Becton Dickinson Antikörper BD 1330 rosettierte 95% aller Thymozyten, der YTS 148.3.2.1 rosettierte 98% und der RmT1 Antikörper brachte es im Mittel auf 96% Rosetten bei der indirekten Avidin-Biotin Rosettierung.

4) Hemmung der Rosettierung mit Biotin

Durch Inkubation der Avidin-beladenen Erythrozyten mit d-Biotin konnte die Rosettenbildung spezifisch gehemmt werden. Eine 50%ige Hemmung wurde mit $0,3 \mu\text{g}$ Biotin pro 20×10^6 SRBC erreicht.

h) Herstellung Antikörper-beladener Erythrozyten nach der Pyridyldisulfid-Technik

Von dem SPDP-modifizierten MRC Ox7 Antikörper (Substitutionsgrad 7) wurde bei der Thiol-Disulfid-Austauschreaktion immer mehr als 30% gebunden, während der SPDP modifizierte RmT1 Antikörper (Substitutionsgrad 5) eine Kopplungseffektivität von ca. 25% ergab. Mit dem SPDP-modifizierten IgM-Antikörper RmT4 (Substitutionsgrad 25) wurde eine Kopplungseffektivität von 40% erreicht. Das bedeutet, daß bei einem Einsatz von 5×10^6 Antikörpermolekülen pro Erythrozyt für die direkte T-Zell Rosettierung immer mehr als 10^6 Antikörpermoleküle pro Erythrozyt kovalent gebunden werden.

i) Direkte T-Zell Rosettierung mit Antikörper-beladenen Erythrozyten

Mit Hilfe der Pyridyldisulfid-Technik wurden unterschiedliche Mengen der monoklonalen Antikörper MRC Ox7 bzw. RmT1 und RmT4 auf SRBC gekoppelt. Anschließend wurde die Funktion der Antikörper-beladenen Erythrozyten in einem direkten Rosettentest und im Rosetten-Stabilitätstest mit AKR Thymozyten als Zielzellen getestet (Tabelle V). Dabei konnten jeweils 93% der Thymozyten rosettiert werden. Die unspezifische Rosettierung wurde für den MRC Ox7 auf Balb/c Thymozyten getestet und betrug 5%. Für den RmT1 und RmT4 Antikörper dienten Lewis Rattenthymozyten als Negativkontrolle und hier machte die unspezifische Rosettierung 6% bzw. 9% aus.

Tabelle V

FUNKTIONSPRÜFUNG ANTIKÖRPERBELADENER ERYTHROZYTEN IM DIREKTEN ROSETTENTEST UND ROSETTEN-STABILITÄTSTEST

KOPPLUNGSTECHNIK	ANTI-KÖRPEREINSATZ (Moleküle/SRBC)	KOPPLUNGS- EFFIZIENZ	ROSETTEN (%)	IF (%)	STABILE ROSETTEN
Pyridyldisulfid	MRC Ox 7				
	5,6 · 10 ⁶	>30%	93	96	+
	1,4 · 10 ⁶		92	95	+
	7,0 · 10 ⁵		30	96	-
	RmT1				
	5,6 · 10 ⁶	25%	93	95	+
	RmT4				
	2,7 · 10 ⁶	40%	93	96	+

j) Analytische Zellseparation durch Avidin-Biotin
Rosettierung

1) Einfluß des Dichtegradienten auf Zellausbeute und
Erythrozytenkontamination in der Interphase

Die Verwendung von käuflichem Ficoll-Lymphozyten-separationsmedium ($d=1,077$ g/ml) resultierte in untragbaren Zellverlusten in der Interphase. Deshalb wurden Percollgradienten mit höherer Dichte hergestellt (90). In Abb. 9 sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus mindestens 3 Separationen für die Zellausbeute dargestellt.

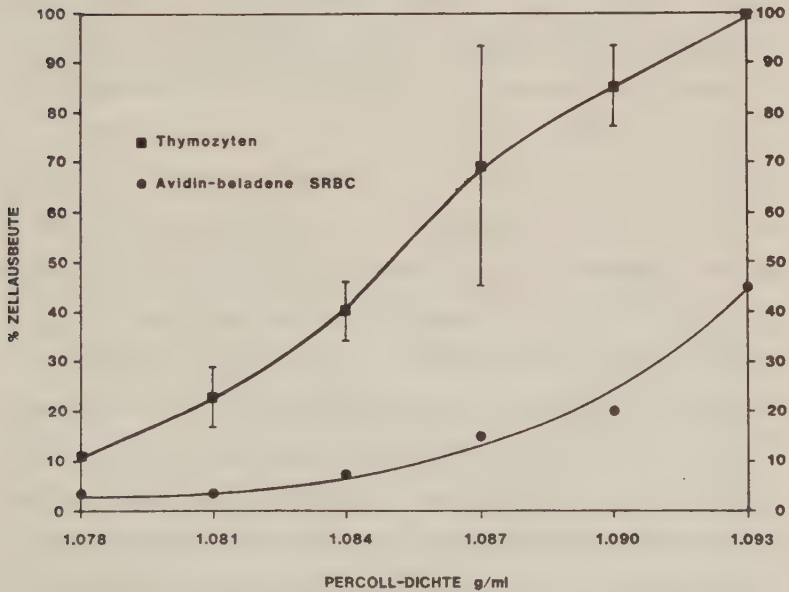


Abb. 9 Einfluß des Dichtegradienten auf Zellausbeute und
Erythrozytenkontamination in der Interphase

Es zeigte sich, daß vernünftige Zellausbeuten von mehr als 50% erst ab einer Percolldichte von mindestens 1,085 g/ml erhalten werden.

Für alle analytischen und präparativen Zelltrennungen wurden deshalb Dichtegradienten der Dichte 1,085 g/ml bis 1,087 g/ml gewählt. Da die Dichteunterschiede zwischen Thy-mozyten und Erythrozyten nicht groß genug sind, ist bei dieser Dichte bereits eine gewisse Kontamination der Interphase mit Erythrozyten zu beobachten.

2) Analytische Zelltrennungen mit Gradienten der Dichte 1,087 g/ml

Wie aus Tabelle VI hervorgeht, betrug die AKR T-Zell Depletion aus künstlichen Thymoztengemischen 97% mit einer sehr geringen Standardabweichung. Etwa 80% der eingesetzten Thymozyten konnten nach der Rosettierung wiedergefunden werden. Betrachtet man nur die Interphase, so gehen nochmals ca. 10% der Thy-1.1-negativen Zellen durch Kosedimentation mit der Rosettenfraktion verloren, so daß die Ausbeute hier nur etwa 70% betrug. Unspezifische Rosetten wurden als Thy-1.2-FITC⁺/Rosette⁺ Zellen nachgewiesen und machten weniger als 0,5% aus. Die Lebensfähigkeit der Interphasezellen wurde durch Trypanblauausschluß (Endkonz. 0,16% in NaCl) bestimmt und war immer größer als 90%. Nimmt man nur Glutaraldehyd-fixierte SRBC anstatt der Avidin-beladenen Erythrozyten, so erhält man weder Rosetten, noch eine Auftrennung von Thy-1.1⁺ und Thy-1.1⁻ Zellen durch den Dichtegradienten allein.

Tabelle VI

ANALYTISCHE ZELLSEPARATION DURCH AVIDIN-BIOTIN
ROSETTIERUNG

T-ZELL DEPLETION	97,1% $\pm$ 0,6%
ZELLAUSBEUTE TOTAL	81 % $\pm$ 11 %
ZELLAUSBEUTE IN DER INTERPHASE	70 % $\pm$ 20 %
KOSEDIMENTATION NEGATIVER ZELLEN	10 % $\pm$ 5 %
ROSETTENKONTAMINATION IN DER INTERPHASE	0,8 % $\pm$ 1 %
ERYTHROZYTENKONTAMINATION IN DER INTERPHASE	15 % $\pm$ 6 %
UNSPECIFISCHE ROSETTIERUNG	<0,5%
VITALITÄT DER INTERPHASEZELLEN	94 % $\pm$ 4 %

MITTELWERTE $\pm$ STANDARDABWEICHUNG AUS 10 VERSUCHEN;
PERCOLL DICHTHE = 1,087 g/ml

k) T-Zell Depletion aus Milz-Knochenmarkgemischen

Bei der Entfernung von T-Zellen aus Milz-Knochenmarkgemischen durch Avidin-Biotin Rosettierung ergab sich wie bei der T-Zell Entfernung aus künstlichen Thymozytengemischen eine maximale T-Zell Depletion von ca. 98%. Mit dem biotinylierten IgM-Antikörper YTS 148.3.2.1 konnten in 3 Versuchen im Mittel $96,9\% \pm 2,5\%$ der Thy-1.2 positiven Milzmarkzellen einer CBL Maus eliminiert werden. Allerdings trat in diesem heterogenen Zellgemisch eine verstärkte unspezifische Adhärenz von Zellen (vor allem Monozyten und Makrophagen) an den Avidin-beladenen Erythrozyten auf, so

daß die Zellausbeute in der Interphase bis zu 30% niedriger lag als bei Trennung von Thymozytengemischen.

Ähnlich schlecht war die Zellausbeute nach direkter Rosettierung mit dem IgM-Antikörper RmT4 und dem IgG 2b - Antikörper RmT1. Mit Pyridyldisulfid-gekoppelten, RmT1-beladenen Erythrozyten konnten in 3 Versuchen im Mittel $98,6\% \pm 0,4\%$ der Thy-1.2-Immunfluoreszenz-positiven Milzmarkzellen einer CBL Maus eliminiert werden. Ein Versuch mit RmT4 -beladenen Erythrozyten ergab eine T-Zell Depletion von 99%. Die direkte Rosettierung mit RmT1-beladenen Erythrozyten erbrachte im Milz-Knochenmarkgemisch der CBL Maus eine T-Zell Depletion von 98%. In allen Fällen war die Lebensfähigkeit der Interphasezellen nach Trypanblauausschluß größer als 92%.

V. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse von Teil B

Es wurde ein direktes und ein indirektes (Avidin-Biotin) Rosettierungsverfahren etabliert, die beide eine Entfernung von T-Zellen aus heterogenen Zellgemischen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern ermöglichen. Dabei wurde erstmals die Pyridyldisulfid-Technik zur kovalenten Beladung von Glutaraldehyd-fixierten Schaferythrozyten mit monoklonalen Antikörpern bzw. Avidin verwendet.

Die beladenen Erythrozyten waren durch die Fixierung äußerst stabil und konnten monatelang in Azid-haltigem Phosphatpuffer gelagert werden. Sie blieben dabei funktionell aktiv und zeigten keine Tendenz zur Aggregation.

Die Funktionsprüfung erfolgte in quantitativen Rosettentests mit Thymozyten, wobei direkte und indirekte Immunfluoreszenz als Vergleich dienten. Es konnte gezeigt werden, daß die Dichte des auf die Erythrozytenmembran gebundenen Antikörpers bzw. Avidins entscheidend ist für die Sensitivität der Rosettierung, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Stabilität der gebildeten Rosetten. Bei der Avidin-Kopplung auf Erythrozyten muß ein Minimum von 1×10^5 Molekülen Avidin pro Erythrozyt gebunden werden um eine annähernd quantitative Rosettierung zu erzielen. Für die Kopplung monoklonaler Antikörper ist eine noch größere Moleküldichte auf der Erythrozytenoberfläche nötig. Es fällt auf, daß die stabilste und sensitivste Rosettierung von Thymozyten erreicht wird, wenn die Moleküldichte auf den Erythrozyten in etwa

den gleichen Wert wie die Antigendichte (87) auf den Thymozyten erreicht, oder überschreitet. Daraus läßt sich der Schluß ableiten, daß die Bildung stabiler Rosetten von der Anzahl und Stärke der geknüpften Bindungen zwischen Erythrozyten und Zielzelle abhängt und daß Mehrfachbindungen (multipoint attachment) erforderlich sind um den bei der Zelltrennung auftretenden Scherkräften standzuhalten. Bei maximaler Moleküldichte auf der Erythrozytenmembran wird die Güte der Rosettierung deshalb von der Affinität des Antikörpers, in erster Linie aber von der Antigendichte auf der Zielzelle abhängen. Bei niedrigen Antigendichten auf der Zielzelle wird die direkte Rosettierung mit nur einem monoklonalen Antikörper versagen. Einen Ausweg bildet die indirekte Rosettierung unter Verwendung mehrerer synergistisch wirkender Antikörper gegen verschiedene Antigene oder Epitope auf der Zielzelle. Die erhöhte Wirksamkeit solcher Antikörper-Cocktails zur T-Zell Eliminierung wurde von anderen Autoren belegt (68).

Indirekte Rosettentechniken mit Protein A- oder anti-Immunglobulin-beladenen Erythrozyten (93,94) werden seit längerer Zeit zum Nachweis zellgebundener Antigene oder zur Zellseparation verwendet. Eine Komplikation dabei stellt jedoch die Kreuzreaktion mit Immunglobulinen oder Oberflächenimmunglobulin-tragenden Zellen dar. Dies wirkt sich vor allem bei der Arbeit mit Maus allo-Antikörpern im Maussystem aus. Mit Hilfe der hier beschriebenen Avidin-Biotin Rosettierung können unerwünschte Kreuzreaktionen mit Immunglobulinen vermieden werden, was sie für die Anwendung im Maussystem prädestiniert.

Die hohe Affinität ($K_D=10^{-15} \text{ M}^{-1}$) der Avidin-Biotin Bindung (70) macht die Avidin-Biotin Rosetten stabiler als andere indirekte Rosetten; eine Stabilität, die bei weitem nicht erreicht wird, wenn man den natürlichen SRBC Rezeptor zur Rosettierung humaner T-Zellen benutzt (96).

Die Avidin-Biotin Technik verbindet somit Vorzüge der direkten Rosettierung - wie hohe mechanische Stabilität der Rosetten und Vermeidung von Kreuzreaktionen - mit den Vorteilen indirekter Techniken, wie z.B. sparsamer Verbrauch von monoklonalen Antikörpern, die Verwendung weniger reiner Antikörperpräparationen oder den synergistischen Einsatz von zwei oder mehr Antikörpern zur Zellseparation.

Im Vergleich zu Protein A- oder Komplement-abhängigen Depletionssystemen (95,31) ist die Avidin-Biotin Technik nicht an eine bestimmte Klasse oder Subklasse von Antikörpern gebunden.

Die für eine sensitive Rosettierung erforderlichen hohen Moleküldichten auf Erythrozyten sind mit herkömmlichen Proteinkopplungstechniken wie Glutaraldehyd-, Carbodiimid- oder Chromchloridkopplung nur schwer zu erreichen, ohne daß eine spontane Agglutination der Erythrozyten auftritt, oder die funktionelle Aktivität der gekoppelten Moleküle verloren geht. Von mehreren getesteten Kopplungstechniken haben sich als Methoden der Wahl die Chromchlorid-Technik (82) und die Pyridyldisulfid-Technik, (69) herauskristallisiert.

Die Chromchloridkopplung ist einfach und äußerst schonend durchzuführen und somit auch bei unfixierten Erythrozyten anwendbar. Bei entsprechend hohem Avidineinsatz ergaben die

Avidin-beladenen Erythrozyten im funktionellen Rosettentest $91\% \pm 3\%$ Rosetten, wobei die Werte unter den beschriebenen Bedingungen nicht immer reproduzierbar waren. Möglicherweise spielt dabei die Herkunft und Beschaffenheit der Erythrozyten eine Rolle. Uhlenbruck (92) beschreibt, daß der unterschiedliche Sialomucopeptid-Gehalt verschiedener Erythrozyten sich auf deren Verhalten im Agglutinationstest auswirkt. Eine neuere Arbeit von Wilson (79) legt den Schluß nahe, daß durch eine Trypsinbehandlung der Erythrozyten und Zugabe des Chromchlorids in einem größeren Volumen eine bessere Reproduzierbarkeit erreicht werden kann.

Die Pyridyldisulfid-Technik kann als Mehrstufenreaktion mit einem heterobifunktionalen Kopplungsreagens weder zu einer intermolekularen Vernetzung von Avidin oder Antikörpern, noch zu einer spontanen Vernetzung der Erythrozyten führen, wodurch viele Einstufenreaktionen mit homobifunktionalem Kopplungsreagens in ihrer Kopplungseffektivität limitiert sind. Im Vergleich zur Chromchlorid-Technik zeigt die Pyridyldisulfid-Technik somit eine deutlich bessere Kopplungseffektivität und es gelingt leicht ein zehnfaches der minimalen Moleküldichte auf der Erythrozytenmembran zu erzeugen. Eine sensitive Rosettierung mit guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist die Folge. So konnten bei der Avidin-Biotin-Rosettierung $96,6\% \pm 1,4\%$ der Thymozyten rosettiert werden. Parallel durchgeführte Immunfluoreszenztests stimmten gut mit diesem Wert überein. Mit der direkten Rosettierung mit Antikörper-beladenen Erythrozyten konnten 93% der Thymozyten rosettiert werden.

Die reproduzierbare Kopplung und die lange Verwendbarkeit der beladenen Erythrozyten machen die Pyridyldisulfid-Technik auch für Festphasen- und Hämagglutinationstests interessant. Die Chromchlorid-Methode arbeitet mit unfixierten Erythrozyten und eignet sich deshalb besonders zur positiven Zellselektion, wo auch die rosettierte Zellfraktion von Interesse ist und von den kontaminierenden Erythrozyten durch Ammonchloridlyse befreit werden kann.

Die Pyridyldisulfid-Technik wird bei Glutaraldehyd-fixierten Erythrozyten angewendet und eignet sich folglich nur zur Gewinnung der Rosetten-negativen Zellfraktion (negative Selektion) also auch zur T-Zell Depletion aus heterogenen Zellgemischen. Die im Vergleich zur Chromchlorid-Methode etwas höhere unspezifische Rosettierung spielt dabei kaum eine Rolle.

Um die Selektivität der Zelltrennung mit den beschriebenen Rosettierungstechniken zu testen, wurden T-Zell Depletionen an künstlichen Thymozytengemischen durchgeführt.

Zur Fraktionierung von rosettierten und nicht rosettierten Zellen wurde ein Dichtegradient der Dichte 1,087 g/ml verwendet. Da die Dichteunterschiede zwischen Thymozyten und Erythrozyten nicht groß sind, muß eine gewisse Kontamination der Interphase mit Erythrozyten in Kauf genommen werden um vernünftige Zellausbeuten zu bekommen. Die T-Zell Depletion wird dadurch jedoch nicht beeinflusst. Sie betrug bei Avidin-Biotin Rosettierung im Mittel $97,1\% \pm 0,6\%$. Das Zelltrennungssystem zeigte damit eine ähnlich gute T-Zell Depletion wie sie für vergleichbare Zelltrennungsmethoden

mit monoklonalen Antikörpern beschrieben wird. Für den Vergleich ist die in einem Arbeitsgang erzielte Depletion maßgebend.

Berenson (60) beschreibt eine T-Zell Depletion von 94%-98% für die Immunadsorption an Antikörper-beladenen Sepharose-Säulen. Owen (55) findet bei magnetischer Zellseparation eine Reinheit von 94%-95% in der negativen Fraktion.

Die hier entwickelte Zelltrennungstechnik erwies sich als sensitiv und bei entsprechendem Arbeitsaufwand auch geeignet große Zellzahlen von bis zu 10 Milliarden zu depletieren, was für die klinische Anwendung der T-Zell Depletion zur Prophylaxe von Graft-versus-Host Reaktionen Voraussetzung ist.

C. ANWENDUNG DER ROSETTIERUNGSTECHNIKEN ZUR UNTERDRÜCKUNG DER AKUTEN GVHD BEI KNOCHENMARKTRANSPLANTATION IM ALLOGENEN MAUSSYSTEM

I. Überblick

Die Untersuchungen konzentrieren sich auf die Beeinflussung der akuten Sekundärkrankheit (GVHD) durch in vitro T-Zell Depletion des hämopoetischen Transplantats mittels der beschriebenen Rosettierungstechniken. In einem direkten Vergleich soll die Transplantatbehandlung durch Komplement vermittelte T-Zell Lyse - mit den gleichen monoklonalen Antikörpern im selben Versuchsansatz - Aufschluß über die Leistungsfähigkeit der Rosettierungssysteme geben.

Als Haupttestsystem für diese Fragestellung wird der Mortalitätstest nach Übertragung eines allogenen Milz-Knochenmarkgemisches auf letal bestrahlte Empfänger gewählt. Aus der klinischen Beobachtung der Tiere ergibt sich dann in Verbindung mit weiteren Testsystemen eine sichere Diagnose und Beurteilung einer Sekundärkrankheit. Die Ergebnisse der einzelnen Tests und Untersuchungen sind nach Versuchsgruppen geordnet und für jede unterschiedlich behandelte Versuchsgruppe getrennt aufgeführt.

II. Material und Methoden

a) Versuchstiere

Zur Knochenmarktransplantation wurden etablierte Inzuchtmäusestämme von den Jackson Laboratories in Bar Harbor, USA, bezogen und im Tierstall der GSF gehalten.

b) Transplantationssystem

Als Spender dienten 12-16 Wochen alte Männchen vom C57BL/6 Stamm. Die Empfänger waren 12-16 Wochen alte CBA/J Weibchen mit einem Gewicht von ca. 24 g. Spender und Empfänger unterscheiden sich neben anderen Merkmalen hinsichtlich ihrer Klasse I und Klasse II Histokompatibilitätsantigene, d.h. sie sind H2 und Ia different.

Der CBA-Stamm besitzt den Haplotyp H2^k, Ia^k während der CBL Stamm durch den Haplotyp H2^b, Ia^b charakterisiert ist. Bei der Knochenmarktransplantation von CBL nach CBA handelt es sich somit um ein allogenes, 2 Haplotyp differentes, stark inkompatibles Transplantationsmodell, welches in der Immunologie häufig verwendet wird.

c) Empfängerkonditionierung (Bestrahlung)

Nach van Bekkum (16) führt eine Ganzkörperstrahlendosis von 9 Gy bei Mäusen innerhalb von 16 Tagen zum Strahlentod der Tiere durch Erlöschen der Hämoopoese, wenn keine Knochenmarktransplantation erfolgt. Andererseits bewirkt diese Dosis noch keine irreversiblen Schäden an anderen lebenswichtigen Geweben (Darmepithel etc.).

Zur Bestrahlung werden nach Gewicht ausgesuchte, 23 g - 25 g schwere CBA Empfänger in eine Plexiglastrommel gebracht und in einer ^{137}Cs Gammacell Bestrahlungsanlage (HWM-D-2000) einer Gammadosis von 9 Gy ausgesetzt. Die Bestrahlung erfolgt zwischen gegenüberliegenden Strahlenquellen mit einer Dosisrate von 1,20 Gy/min. Sie wird 24 h vor der Knochenmarktransplantation durchgeführt um eine gute Immunsuppression des Empfängers mit ausreichend Raum für die Spenderhäthropoese zu erzielen.

d) Transplantationstechnik

1) Gewinnung von Milzzellen

Die Spendermäuse werden mit Äther getötet und die Milz aus der Bauchhöhle entnommen. Durch eine Nylonsiebpassage wird, wie für die Thymozytengewinnung beschrieben, eine Einzelzellsuspension in Medium Leibowitz (L-15) hergestellt und auf Eis gekühlt.

2) Gewinnung von Knochenmarkzellen

Zur Gewinnung einer Knochenmarkzellsuspension werden Femur- und Tibiaknochen der Spendermäuse von Haut und Muskulatur befreit. Der Femur wird am Schaft unterhalb des Femurkopfes und oberhalb der Femurkondylen mit einer Schere durchtrennt. Die Tibia wird unterhalb des Tibiakopfes und in Höhe des Ansatzes der Fibula abgeschnitten. Anschließend spült man das Knochenmark mit 10 ml Medium L-15 aus den Knochenschäften. Man benutzt dazu eine Plastikspritze mit feiner Kanüle, die von einer Seite her

in den Knochenschaft eingeführt wird. Durch mäßigen Druck werden die Markzylinder ausgespült und in einer sterilen Plastik-Petrischale durch mehrmalige Aspiration in eine Einzelzellsuspension überführt.

3) Herstellung von Milz-Knochenmarkgemischen

Milz- und Knochenmarkzellen werden in 3% Essigsäure gezählt und nach Zellzahl im Verhältnis 2:1 gemischt. Dieses als Milzmark bezeichnete Gemisch enthält bei CBL Spendern ca. 20% T-Zellen, womit bei der Transplantation menschliche Verhältnisse simuliert werden sollen.

4) Milzmarktransplantation

Bei Transplantation auf letal bestrahlte CBA Empfänger verursachen diese Milzmarkzellen eine akute Graft-versus-Host Reaktion, welche durch T-Zell Depletion in vitro verhindert werden soll. Nach GvHD-Prophylaxe und Prüfung der Vitalität durch Trypanblauausschluß werden pro Empfängermaus 50×10^6 lebende, kernhaltige Milzmarkzellen transplantiert. Die Zellzahl wird in 0,3 ml Medium L-15 mit Hilfe einer Tuberkulinspritze mit feiner Kanüle in die Schwanzvene des Empfängers appliziert.

e) GvHD-Prophylaxe durch in vitro T-Zell Depletion

1) Avidin-Biotin Rosettierung

Das Milzmarktransplantat wurde durch Avidin-Biotin Rosettierung mit biotinyliertem YTS 148.3.2.1 Antikörper von T-Zellen befreit, wobei nach der Chromchlorid-Methode und nach der Pyridyldisulfid-Methode mit Avidin beladene Erythrozyten zum Einsatz kamen (Versuchsgruppe C und B).

Zur Transplantation von 10 Mäusen werden $2,5 \times 10^9$ Milzmarkzellen in 3 ml Medium L-15 resuspendiert und mit 3,6 mg des biotinylierten YTS 148.3.2.1 Antikörpers in 2 ml PBS abgesättigt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wird 2x mit PBS gewaschen. Die Rosettierung und Zelltrennung erfolgt mit einem 13fachen Überschuß an Avidin-beladenen Erythrozyten und einem Percollgradienten der Dichte 1,085 g/ml.

2) Direkte Rosettierung

Für die direkte Rosettierung werden Erythrozyten nach der Pyridyldisulfid-Technik kovalent mit dem RmT1 Antikörper beladen wie in Teil B beschrieben. Die Rosettierung und Zelltrennung erfolgt mit 13fachem Erythrozytenüberschuß und einer Percolldichte von 1,085 g/ml. Zur Transplantation von 10 Mäusen werden ebenfalls $2,5 \times 10^9$ Milzmarkzellen von T-Zellen depletiert.

3) Komplement-vermittelte T-Zell Lyse

Zur T-Zell Depletion von Milzmark für 15 Empfängermäuse mit Hilfe der Komplementlyse werden 1×10^9 Milzmarkzellen benötigt. Diese werden in 1460 μ l Medium L-15 resuspendiert und mit einer sättigenden Menge des jeweiligen monoklonalen Antikörpers in 400 μ l PBS vermischt (400 μ l YTS 148.3.2.1 = 1,45 mg, 400 μ l RmT1 = 0,25 mg).

Anschließend wird 140 μ l Kaninchenserum als heterologe Komplementquelle hinzugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Das Kaninchenserum war mit CBL Lymphknoten- und

Thymuszellen absorbiert. Es war im Lymphozytotoxizitätstest in der entsprechenden Verdünnung vorher auf Aktivität und fehlende Toxizität ohne Antikörper geprüft worden. Nach Bestimmung der Vitalität werden 50×10^6 der inkubierten, nicht mehr gewaschenen Milzmarkzellen transplantiert.

f) Testsysteme zur Beurteilung von GvH-Reaktionen

1) Mortalitätstest

Beim akuten Mortalitätstest wird der Einfluß einer bestimmten Behandlungsmethode auf die Überlebenszeit der Empfänger eines allogenen Milzmarktransplantats gemessen. Als Kontrollen dienen unbehandelt transplantierte Tiere, nicht transplantierte (Strahlenkontrolle) und syngen transplantierte Tiere. Neben dem Zeitpunkt des Todes wird der klinische Zustand der Empfänger nach der Transplantation verfolgt. Dazu werden die Tiere wenn möglich täglich gewogen und auf äußere Symptome einer GvHD untersucht. In den Fällen, wo sich der klinische Allgemeinzustand soweit verschlechtert hatte, daß die Tiere keine Nahrung mehr aufnahmen und am selben Tag zu sterben drohten, wurden die Tiere als tot gewertet und der zytogenetischen bzw. histopathologischen Beurteilung zugeführt.

2) Histopathologische Beurteilung

Die histopathologische Beurteilung GvH-spezifischer Gewebeveränderungen ermöglicht die Objektivierung der beobachteten klinischen Symptome, indem sie andere Faktoren, wie z.B. Infektionen oder Strahlenschäden als primäre Todesursache ausschließt.

Zu den spezifisch GvH-induzierten Gewebeveränderungen gehört die Infiltration und Schädigung vieler Organe durch lymphoide Zellen, die lokale oder generelle Atrophie lymphatischer Organe und in schweren Fällen die meist irreversible Gewebeerstörung mit Verlust der Kompartimentierung in den betreffenden Organen.

Die Histologie ermöglicht nicht nur die Erkennung degenerativer Veränderungen, sie gibt auch Aufschluß über den Chimärismus und den Stand der Regeneration in den T- und B-Zell-abhängigen Bezirken der lymphatischen Organe.

Die histopathologische Beurteilung wurde anhand von Stichproben aus den verschiedenen Versuchsgruppen in Kooperation mit Frau Doktor Hoffmann-Fezer in der GSF durchgeführt.

Dazu werden die Tiere kurz nach dem Tod obduziert, Thymus und Milz gewogen und weitere Organe zur Anfertigung von Gewebeschnitten entnommen.

Die Infiltration von Organen mit lymphoiden Zellen wird an Paraffinschnitten mit Hilfe einer Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung sichtbar gemacht. Die Repopulation lymphatischer Organe mit Zellen der T- und B-Reihe wird an Gefrierschnitten mit einer von Frau Hoffmann-Fezer entwickelten indirekten Immunperoxidase-Technik (97) analysiert. Der Spender-T-Zell Chimärismus kann dabei mit den im folgenden Abschnitt beschriebenen monoklonalen Antikörpern belegt werden.

3) Nachweis des Spenderzellchimärismus

Für die sichere Diagnose einer GvHD bzw. eines Transplantationserfolges ist stets der Nachweis eines Spenderzellchimärismus zu führen, um ein Nichtanwachsen des Transplantats (Graft failure) oder eine verspätete Transplantatabstoßung bei Wiederauftauchen der Empfänger-eigenen Hämapoese (Reversion) auszuschließen.

Die Besiedlung des lymphohämoetischen Systems im Empfänger mit Zellen vom Spendertyp kann immunologisch und zytogenetisch mit Hilfe von Markerchromosomen nachgewiesen werden.

α) Immunologischer Nachweis

Zum immunologischen Nachweis von Spender T-Zellen im Empfängergewebe wurde ein biotinylierter monoklonaler Antikörper gegen das Lyt 1.2 Alloantigen (New England Nuclear NEI-017) benutzt. Während CBA T-Zellen das Lyt 1.1 Alloantigen ausprägen, können CBL T-Zellen anhand ihres Lyt 1.2 Alloantigens identifiziert werden. Dabei wird ein indirektes Nachweissystem mit Avidin-FITC bzw. Peroxidase-markiertem Avidin als 2. Stufe verwendet.

Zum Nachweis von Empfängergewebe diente ein biotinylierter monoklonaler anti $H2^k$ Antikörper (Camon, Nr. 9005, Wiesbaden, FRG). Dieser reagiert nur mit dem $H2^k$ Allotyp von CBA-Zellen, nicht jedoch mit dem $H2^b$ Allotyp von CBL-Zellen.

β) Zytogenetischer Nachweis

Wegen der quantitativen und zuverlässigen Aussagen über das Anwachsen oder die Abstoßung eines Transplantats wird der zytogenetische Nachweis eines Spenderzellchimärismus mit Hilfe von Markerchromosomen (98) heute überall praktiziert. Da Mäusestämme mit Markerchromosomen nicht zur Verfügung standen, wurden männliche Spenderzellen auf weibliche Empfänger transplantiert und das Y-Chromosom als Marker verwendet. In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. J. Wienberg vom Institut für Anthropologie und Humangenetik wurde eine C-Banden Färbung an Metaphasechromosomen entwickelt. Sie ermöglicht die schnelle und sichere Identifizierung des Y-Chromosoms in Spenderzellmitosen am Fehlen einer C-Bande und an einer dunkleren Färbung des Y-Chromosoms im Vergleich zum X-Chromosom und den Autosomen.

Weibliche Empfängerzellmitosen werden anhand ihrer ausnahmslos C-Banden tragenden Chromosomen erkannt. Ein im CBA Stamm gefundener Heterochromatinpolymorphismus an 4 der 40 Metaphasechromosomen ermöglicht als zusätzlicher Marker eine schnelle und eindeutige Unterscheidung hämopoetischer Spender- und Empfängerzellen (Abb. 10).

Bei der C-Banden Färbung von Mäusechromosomen wird das konstitutive Heterochromatin in der Zentromerregion des X-Chromosoms und der Autosomen hervorgehoben.

Sie wird folgendermaßen durchgeführt:

Zur Gewinnung mitotischer Zellen wird den auf Chimärismus zu untersuchenden Mäusen 120 µg Colchizin (Serva, Heidelberg, FRG) in 0,3 ml 0,54% NaCl intraperitoneal verabreicht.

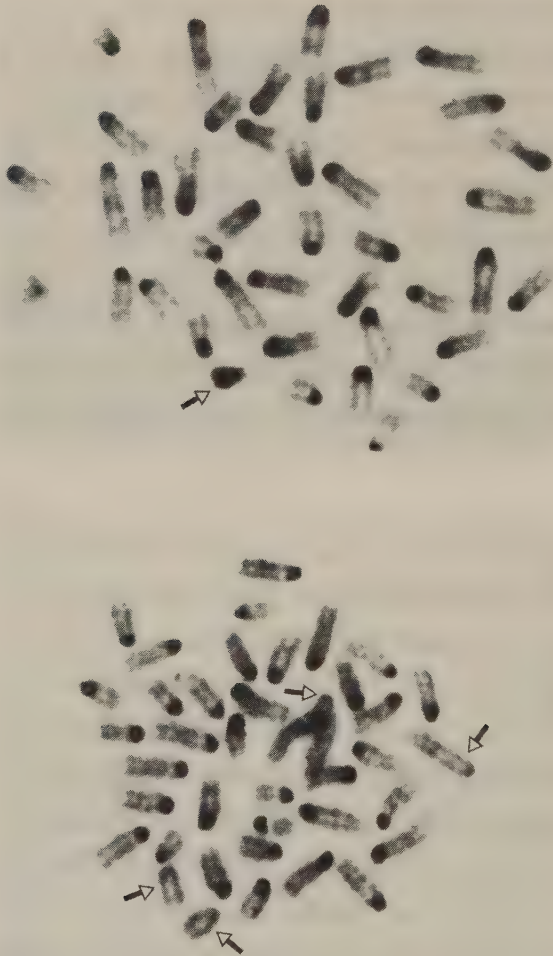


Abb. 10 C-Banden Färbung an Metaphasechromosomen zum zyto-
genetischen Nachweis eines Spenderzellchimärismus.

oben: Männliche C57BL/6 Spenderzelle. Das Y-Chromosom (Pfeil) hat keine C-Bande. Es ist dunkler gefärbt als das Euchromatin des X-Chromosoms und der Autosomen und liegt meist am Rand der Metaphaseplatte.

unten: Weibliche CBA Empfängerzelle. Hier fehlt das Y-Chromosom. Eine positive Identifizierung ist aufgrund eines Heterochromatin-Polymorphismus bei zwei Autosomenpaaren (Pfeile) möglich, welcher sich nicht im C57BL/6 Stamm findet.

Nach einer Wartezeit von 2 Stunden werden die Tiere getötet und Milz und Knochenmarkzellen, wie auf S. 75 beschrieben, getrennt für jede Maus in Hank'scher Lösung gewonnen. Die Zellsuspensionen werden 10 min lang bei 200xg zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Das Sediment wird in ca. 1 ml Hank'scher Lösung resuspendiert und vorsichtig mit 10 ml einer warmen hypotonen 67 mM/l KCl Lösung in Wasser versetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C im Brutschrank wird erneut abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nun werden 5 ml eisgekühltes Fixativ (3 Teile Methanol, 1 Teil Eisessig) zum Sediment gegeben, die Zellen mit einer Pasteurpipette vorsichtig resuspendiert und für 30 min im Kühlschrank inkubiert. Unter Verwendung neuer Fixativ-Lösung wird der Vorgang des Fixierens noch ein- bis zweimal wiederholt, bis der Zellrückstand weiß ist. Zum Schluß wird das Sediment in ca. 2 ml Fixativ resuspendiert.

Einige Tropfen dieser Suspension werden auf eisgekühlte, saubere und fettfreie Objektträger aus 15-20 cm Höhe aufgetropft. Dabei platzt die Zellmembran und die Metaphasechromosomen breiten sich radial aus. Dieser Vorgang wird durch leichtes hin- und herkippen des Objektträgers begünstigt. Anschließend wird der Objektträger kurz durch eine Flamme gezogen und luftgetrocknet.

Nach einem Tag Lufttrocknung kann die C-Banden Färbung erfolgen. Dazu werden die Objektträger 30 min lang in 0,2 n HCl getaucht und dann mit H₂O dest gespült.

Anschließend kommen sie für 10 min in ein 60°C warmes Bad mit einer in Wasser gesättigten (5%) Bariumhydroxid-Lösung. Durch kurzes Eintauchen in 0,05 n HCl wird dann restliches Ba(OH)₂ abgewaschen und die Objektträger in 2xSSC Citratpuffer 1 h bei 60°C inkubiert. Die Objektträger werden schließlich mit Wasser gespült, mit 7% Giemsa-Lösung in Mc Illvain's Puffer pH 6,9 15 min lang gefärbt, erneut gespült und luftgetrocknet. Die trockenen Objektträger werden eine halbe Stunde lang in Xylol entwässert, mit Einbettlösung (Eukitt, Kindler, Freiburg. FRG) betropft und mit einem großen Deckglas versehen. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung werden für jedes Tier 100 Mitosen auf die Präsenz des Y-Chromosoms (Spenderzellmitose) oder auf das für weibliche Empfängerzellmitosen spezifische C-Bandenmuster hin untersucht.

4) Hauttransplantation

Die Überlebenszeit von Hauttransplantaten bei Langzeitchimären gibt Aufschluß über die erzielte spezifische Toleranz und die Wiederherstellung der zellulären Immunantwort bei diesen Tieren. Bei vollständigem Spenderzellchimärismus sollten diese Chimären Hauttransplantate vom Typ des ursprünglichen Milzmarkspenders tolerieren, während allogene Haut von einem dritten Spender abgestoßen wird.

Bei der Hauttransplantation wurde eine von Rodt und Thierfelder praktizierte Technik (66) übernommen. Dabei werden Mäuse des Spenderstammes mit Äther getötet. Nach einem ringförmigen Schnitt am Schwanzansatz und einem Längsschnitt auf der Oberseite kann die Schwanzhaut in einem Stück abgezogen werden. Sie wird in NaCl gewaschen und gelagert. Von der breiteren Seite des Hautbandes her werden nun bis zu fünf 1 cm lange Stücke mit etwa 1 cm² Fläche abgeschnitten. Der schmalere Rest wird verworfen.

Die Empfängermause werden durch intraperitoneale Injektion von 5 mg Evipan-Natrium (Bayer, Leverkusen) in 0,25 ml NaCl betäubt. Mit einer Pinzette wird dann im Bereich der oberen Körperhälfte eine Hautfalte abgehoben und mit Hilfe einer spitzen Schere ein quadratischer, in der Form dem Hauttransplantat entsprechender Hautbezirk von der Unterhaut abpräpariert. Auf die Wundfläche wird ein Hauttransplantat aufgelegt und mit der Pinzette so eingepaßt, daß Transplantat und Wundränder eben anliegen. Auf das Transplantationsfeld wird ein 2x2 cm großes Stück Cura-Tuell (Lohmann) aufgestrichen.

Darüber wird mit Leukovlies (Beiersdorf) ein Zellstoffpolster geklebt und die Maus ringförmig mit Leukoplast bandagiert um eine mechanische Beeinflussung des Transplantats durch Kratzen und Beißen auszuschließen. Der Verband wird nach jeder Kontrolle so lange erneuert bis eine derartige Beeinflussung nicht mehr zu befürchten ist.

Ab dem 14. Tag nach Transplantation werden die Tiere alle 3 bis 4 Tage auf Abstoßungsreaktionen hin untersucht. Dazu wird die oberste abgeschieferte Hautschicht, soweit dies leicht und ohne Schädigung des Transplantates möglich ist, entfernt. Das darunterliegende, zunächst haarlose Transplantat wird durch Inspektion und Palpation auf mögliche Abstoßung begutachtet. Abstoßungszeichen sind Verdickung des Transplantats und seiner Ränder, eine rot-violette Verfärbung mit einer Schrumpfung und Ablösung des Transplantats. Zeigt mehr als die Hälfte des Transplantats solche Abstoßungserscheinungen, gilt das Transplantat zu diesem Zeitpunkt als abgestoßen.

Angewachsene Haut bildet ca. 3 Wochen nach Transplantation Haare mit der Haarfarbe des Spenders.

III. Ergebnisse

Gruppe A: Unbehandelte, allogene Milzmark-Transplantation

In 2 Versuchen wurden insgesamt 15 Mäuse ohne vorherige T-Zell Depletion mit allogenem Milzmark transplantiert. Alle Tiere verstarben innerhalb kurzer Zeit an einer akuten GvHD. Die ersten klinischen Symptome zeigten sich nach 5 bis 6 Tagen, beginnend mit einem gesträubten Fell, einer gekrümmten Hockstellung und einem eigentümlich wankenden Gang. Nach etwa 7 Tagen bekamen die Tiere einen feuchten, klebrigen Stuhl verbunden mit einer Polyurie. Sie nahmen keine Nahrung mehr auf und verstarben nach rasch fortschreitender Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes (Abb. 14, Seite 91). Die mittlere Überlebenszeit betrug $9,6 \pm 0,55$ Tage mit einer 50% Mortalität am 8. Tag nach Transplantation. Die Mäuse starben damit früher als die nicht transplantierte Strahlenkontrolle (Gruppe I). Der akute Verlauf wird auch an der Körpergewichtskurve (Abb. 11) deutlich. Die Tiere zeigten zwischen dem 5. und 7. Tag eine rapide Gewichtsabnahme, wobei nach der normalen, strahlenbedingten Abnahme in den ersten 2 Tagen keine wesentliche Erholung mehr zu beobachten war. Das mittlere Milzgewicht von 9 untersuchten Tieren am Todestag betrug $60,9 \pm 22$ mg, was etwa die Hälfte bis zwei Drittel einer normalen Milz ausmacht. Der Thymus war klein, leicht ($1,8 \pm 1$ mg) und mit einer Gesamtzellzahl von ca. 1×10^5

kernhaltigen Zellen nahezu zellfrei. Bei der histologischen Untersuchung war eine lymphatische Hypoplasie in Thymus, Lymphknoten und in der Milz zu beobachten. Die Milz als lympho- und hämopoetisches Organ zeigte in der für die Hämoese zuständigen roten Pulpa eine Hyperplasie, in der für die Lymphopoese zuständigen weißen Pulpa dagegen eine teilweise Aplasie mit vereinzelt entzündlichen Veränderungen (Granulozyteninfiltrate). Lyt 1.2-positive Spenderzellen fanden sich sowohl in den T-Zell abhängigen, als auch in den B-Zell abhängigen Bereichen, wobei die normale Kompartimentierung nicht mehr vorhanden war. Das Bindegewebe war H2^k positiv.

Die starke bis mittelgradige Infiltration anderer, nicht lymphatischer Organe kann als weiteres Indiz für eine akute GvHD gelten. So waren unter anderem Leber und Haut mittelgradig, die Zunge (Abb. 12) dagegen stark mit lymphoiden und monozytären Zellen infiltriert. Die zytogenetische Untersuchung eines am 7. Tag nach Transplantation getöteten Tieres ergab eine leicht erhöhte mitotische Aktivität in Milz und Knochenmark mit 100% Spenderzellmitosen. Der Mitoseindex (Mitosen/Interphasen) betrug 5% im Knochenmark und 2% in der Milz.

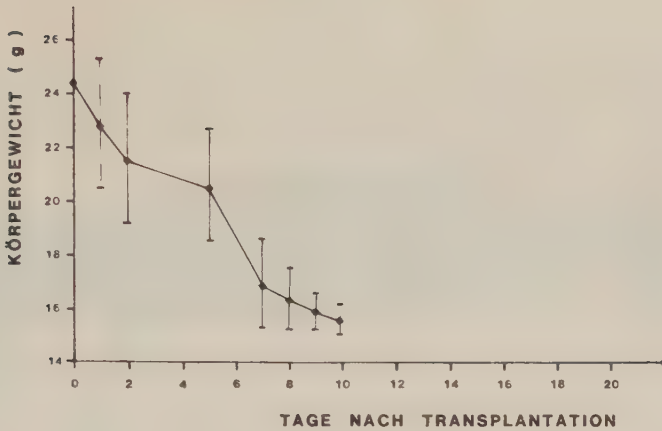


Abb. 11 Körpergewichtsverlauf nach unbehandelter allo-gener Milzmark-Transplantation (Mittelwerte $\pm$ s; n = 10)

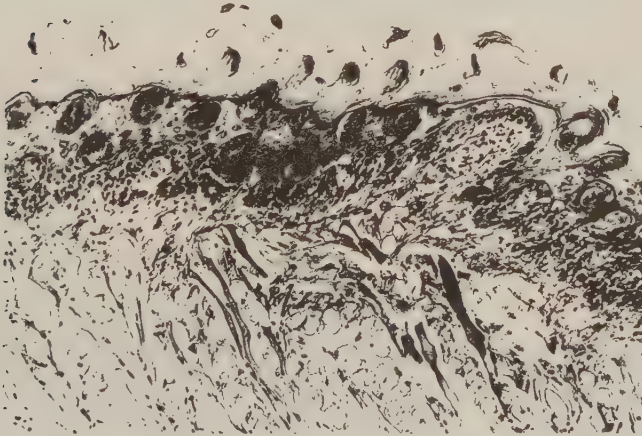


Abb. 12 Histologischer Schnitt der Zunge einer unbehandelt transplantierten Kontrollmaus mit akuter GvHD. Starke subepitheliale Infiltration mit lymphoiden und monozytären Zellen (H.E.-Färbung, ca 130x).

Gruppe B: Allogene Milzmark-Transplantation nach GvHD-
Prophylaxe durch Avidin-Biotin Rosettierung mit
dem IgM-Antikörper YTS 148.3.2.1

In 2 Versuchen erhielten insgesamt 10 Empfänger T-Zell depletierte allogene Milzmarkgemische. Zur Rosettierung wurden nach der Pyridyldisulfid-Technik mit Avidin beladene Erythrozyten verwendet. Dabei konnte eine T-Zell Depletion von 94% im ersten und 98% im zweiten Versuch erreicht werden. Im Gegensatz zum akuten GvHD-Verlauf bei unbehandelten Tieren zeigten die Avidin-Biotin rosettierten Mäuse am 10. Tag nach Transplantation noch keine Anzeichen einer Erkrankung (Abb. 13). Ab dem 15. Tag traten jedoch wieder die bekannten klinischen Symptome einer schweren GvHD auf, welche schließlich zum Tod der Tiere führten. Die mittlere Überlebenszeit betrug $20,4 \pm 1,6$ Tage mit einer 50% Mortalität am 20. Tag nach Transplantation. Die Tiere überlebten damit länger als die unbehandelten (Gruppe A) und nicht transplantierten (Gruppe I) Kontrollgruppen (Abb. 26, Seite 110). Auch der Verlauf der Körpergewichte wich deutlich von den Kontrollen ab (Abb. 15) Im Gegensatz zum einphasigen Gewichtsverlauf bei den Kontrollen ergab sich nach Avidin-Biotin Rosettierung ein zweigipfelter Gewichtsverlauf mit ersten Anzeichen einer Erholung am 5. Tag und einer zweiten Phase der Erholung am 11. Tag nach Transplantation. Trotz der beobachteten Gewichtszunahmen blieben die Körpergewichte stets deutlich unter dem Ausgangsgewicht zurück und ab dem 14. Tag nach



Abb. 13 Klinischer Zustand nach allogener Milzmark-Transplantation und T-Zell Entfernung durch Avidin-Biotin Rosettierung mit YTS 148.3.2.1 Das Empfängertier zeigt am 10. Tag nach Transplantation keine pathologischen Erscheinungen.

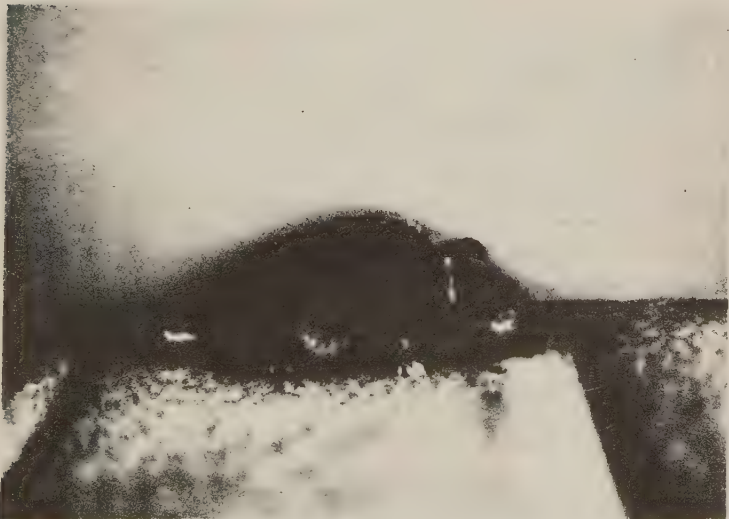


Abb. 14 Klinischer Zustand nach unbehandelter allogener Milzmark-Transplantation. Das Empfängertier zeigt am 10. Tag nach Transplantation typische Symptome einer schweren GvHD mit gesträubtem Fell und eingefallenen Flanken und einer gekrümmten Kauerstellung.

Transplantation traten die für eine fatale GvHD typischen rapiden Gewichtsverluste auf. Das mittlere Milzgewicht von 5 untersuchten Tieren am Todestag war mit $33 \pm 7,6$ mg niedriger als bei der Kontrolle mit akuter GvHD. Bei 2 Tieren waren bereits bei makroskopischer Inspektion Milzkolonien zu beobachten. Das mittlere Thymusgewicht war mit $3,4 \pm 0,8$ mg nur unwesentlich größer als bei den Kontrollen.

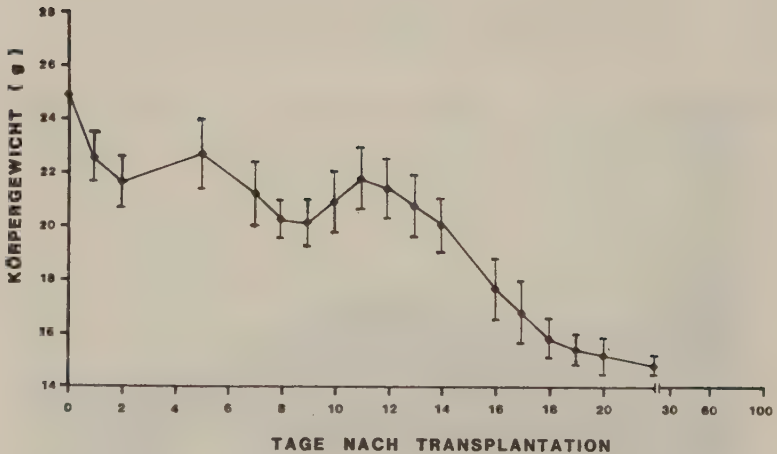


Abb. 15 Körpergewichtsverlauf nach T-Zell Entfernung durch Avidin-Biotin Rosettierung mit YTS 148.3.2.1 im allogenen Milzmarktransplantat (Mittelwerte $\pm$ s; n = 9).

An Gewebeschnitten war eine ausgeprägte lymphatische Atrophie in Thymus, Lymphknoten und in der Milz festzustellen. Die Milz wies eine hyperplastische rote Pulpa auf, wobei es sich bei der großen Masse der Zellen um unreife hämopoetische Zellen handelte. Einzelne Lymphozyten, die zum Teil Lyt 1.2 positiv, zum Teil Lyt 1.2 negativ waren, fanden sich locker verstreut über die gesamte rote Pulpa. Die weiße Pulpa war nahezu zellfrei (Abb. 16), wobei sich in einigen Tieren amyloidartige Ablagerungen in der B-Zell Zone gebildet hatten. Auch eine teilweise oder großflächige Zerstörung des $H2^k$ positiven Bindegewebsgerüsts war zu beobachten.

Die lymphatische Aplasie bzw. Atrophie kommt auch bei den für die einzelnen Organe ermittelten Gesamtzellzahlen zum Ausdruck. So wiesen die Milzen am Todestag im Mittel $5,2 \times 10^6 \pm 3,3 \times 10^6$ kernhaltige Zellen auf, die mesenterialen Lymphknoten ca. 4×10^5 und der Thymus nur etwa 1×10^5 Zellen. Während beim akuten Krankheitsverlauf von Gruppe A die lymphatische Atrophie nur gering ausgeprägt war und die Infiltration verschiedener Organe mit mononukleären Zellen vorherrschte, war es beim verzögerten Krankheitsverlauf der Avidin-Biotin rosettierten Gruppe umgekehrt. Hier war die lymphatische Atrophie stark ausgeprägt, die Infiltration von Leber, Herz, Zunge und Haut nur gering.

Von 3 Tieren wurden am 20. Tag nach Transplantation Ausstriche von peripherem Blut aus der Schwanzspitze angefertigt (Tabelle VII).

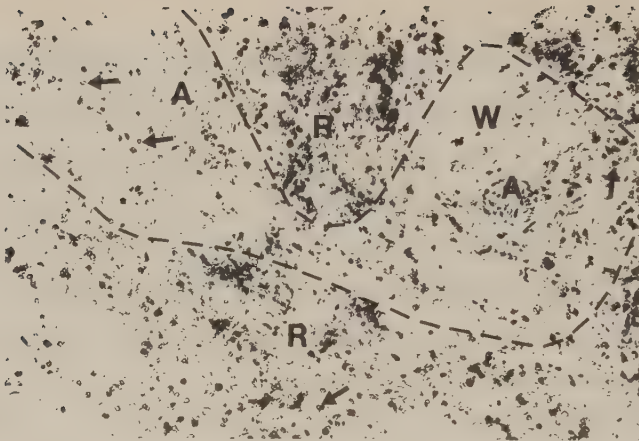


Abb. 16a

Periarterioläre Zone der Milz einer allogenen transplantierten Maus nach T-Zell Entfernung durch Avidin-Biotin Rosettierung mit YTS 148.3.2.1. (Tag 19 nach Transpl.). Die weiße Pulpa ist nahezu zellfrei. Vereinzelte Spender-T-Lymphozyten vom Lyt-1.2⁺ Phänotyp (Pfeile) wurden mit einer indirekten Immunperoxidase-Technik markiert (ca. 130x).



Abb. 16b

Periarterioläre Zone der Milz einer unbehandelt transplantierten Kontrollmaus mit akuter GvHD am Tag 7 nach Transpl. Ungeordnete, zellreiche weiße Pulpa (H.E.-Färbung, ca. 130x).

A= Zentralarteriole, W= Weiße Pulpa, R= Rote Pulpa
-- = Verlauf der Grenze zwischen roter und weißer Pulpa.

Tabelle VII.

BLUTBILD NACH AVIDIN-BIOTIN ROSETTIERUNG (GRUPPE B)

	Gruppe B	normal	syngen Kontrolle (Gruppe F)
Lymphozyten	15 $\pm$ 1,5%	70-80%	28%
Monozyten	16 $\pm$ 2.1%	0-4 %	4%
Granulozyten	68 $\pm$ 5 %	20-30%	68%

Das weiße Blutbild spiegelt ebenfalls die histologisch beobachtete lymphatische Atrophie wider. Es zeigte sich auch gegenüber der syngen Kontrolle eine deutliche Lymphozytopenie, verbunden mit einer Monozytose und einer relativen Granulozytose.

Die zytogenetische Untersuchung eines am 19. Tag nach Transplantation getöteten Tieres ergab eine mit normalen Mäusen vergleichbare oder leicht verminderte mitotische Aktivität im Knochenmark mit 100% Spenderzellmitosen. Die Zellzahl im Knochenmark hatte zu diesem Zeitpunkt noch keine Normalwerte erreicht.

Gruppe C: Allogene Milzmark-Transplantation nach suboptimaler T-Zell Depletion

Zur T-Zell Rosettierung wurden unfixierte, nach der CrCl_3 -Technik mit Avidin beladene Erythrozyten verwendet, wobei die Avidin-Kopplung nicht optimal war. Die erzielte T-Zell Depletion im Milzmarktransplantat mit

biotinyliertem YTS 148.3.2.1 betrug deshalb nur etwa 70%. In 2 Versuchen erhielten insgesamt 10 Empfänger solche suboptimal depletierten Milzmarkgemische. Die transplantierten Tiere zeigten nach etwa 10 Tagen alle Symptome einer schweren GvHD und verstarben kurze Zeit später. Die mittlere Überlebenszeit betrug $12,5 \pm 0,7$ Tage mit einer 50% Mortalität am Tag 13 nach Transplantation. Die Körpergewichte (Abb.17) zeigten den für eine akute GvHD typischen einphasigen Verlauf mit einer raschen Gewichtsabnahme nach dem 5. Tag ohne nochmalige Erholung. Das mittlere Milzgewicht von 6 untersuchten Tieren am Todestag betrug $35,1 \pm 12$ mg, das Thymusgewicht nur $1,7 \pm 0,7$ mg. Das Knochenmark der Tiere war mit $9,5 \times 10^6$ Zellen deutlich stärker besiedelt als das aplastische Knochenmark der nicht transplantierten Kontrolle ($2,1 \times 10^6$ kernhaltige Zellen).

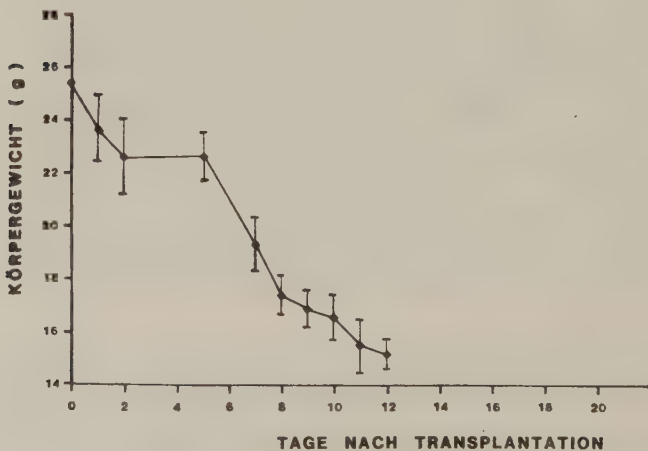


Abb. 17 Körpergewichtsverlauf nach suboptimaler T-Zell Depletion im allogenen Milzmark-Transplantat (Mittelwerte $\pm$ s; n=6).

Gruppe D: Allogene Milzmark-Transplantation nach Antikörperbehandlung ohne Komplement.

Um eine mögliche Immunsuppression durch den Antikörper YTS 148.3.2.1 alleine, bzw. in Verbindung mit dem Empfänger-eigenen Komplementsystem zu untersuchen wurde das Milzmarktransplantat bei 37°C in vitro mit YTS 148.3.2.1 inkubiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden 50×10^6 allogene Milzmarkzellen transplantiert. Die 5 Empfänger zeigten gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe nur eine geringfügig verzögerte Mortalität. Sie überlebten im Mittel $12 \pm 2,2$ Tage. Die ersten klinischen Symptome wurden am 7. Tag nach Transplantation beobachtet. Der einphasige Gewichtsverlauf mit rascher Gewichtsabnahme ohne nochmalige Erholung ist dem der suboptimal depletierten Gruppe C vergleichbar und deutet auf eine akute GvHD hin.

Gruppe E: Allogene Milzmark-Transplantation nach Komplement-vermittelter T-Zell Lyse mit dem monoklonalen IgM-Antikörper YTS 148.3.2.1

In 2 Versuchen erhielten insgesamt 12 Empfänger allogene Milzmarktransplantate, welche vorher einer Komplement-vermittelten T-Zell-Lyse mit YTS 148.3.2.1 unterworfen wurden. Der Anteil an Thy 1.2 positiven Zellen im unbehandelten Milzmark wurde mit 17% bzw. 20% bestimmt. Nach der

Komplementlyse fanden sich im Transplantat jeweils 18% tote, Trypanblau-positive Zellen. Ein genauer Wert für die T-Zell Eliminierung ist bei der Komplementlyse-Technik allerdings schwer zu bestimmen, da die toten Zellen im Transplantat verbleiben.

Die transplantierten Mäuse entwickelten eine verzögerte, chronische GvHD, in deren Verlauf etwa 50% der Tiere starben (Abb.18). Am besten läßt sich der chronische Krankheitsverlauf an der Gewichtskurve (Abb.19) verfolgen. Die Körpergewichte wiesen Maxima am 5. und 16. Tag nach Transplantation auf. Nach der vorübergehenden Erholung am 16. Tag folgte eine Phase der körperlichen Auszehrung mit kontinuierlichem Gewichtsverlust bis etwa zum 40. Tag nach Transplantation. Erste klinische Krankheitssymptome wurden am 25. Tag nach Transplantation beobachtet. Während 50% der Tiere zwischen dem 30. und 40. Tag nach Transplantation verstarben, konnte sich die andere Hälfte erholen und überlebte den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen. Diese späte Phase der Erholung war durch eine kräftige Gewichtszunahme gekennzeichnet, wobei aber die Ausgangskörpergewichte erst nach dem 100. Tag nach Transplantation überschritten wurden.

Das mittlere Milzgewicht am Todestag betrug $43,6 \pm 9$ mg. Bei zwei Tieren waren makroskopisch sichtbare Milzkolonien vorhanden. Das Thymusgewicht der verstorbenen Tiere war mit $2,0 \pm 0,14$ mg noch gering. Thymus und Lymphknoten waren zellarm und mit wenigen Lyt 1.2 positiven Zellen besetzt.

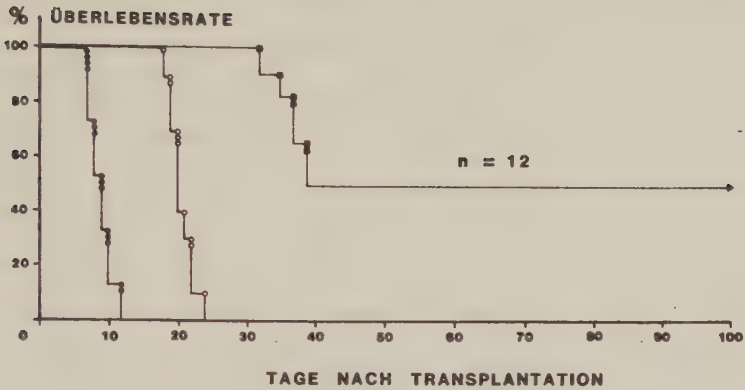


Abb. 18 100 Tage Mortalität nach unterschiedlicher Transplantatbehandlung in vitro

- Unbehandelt
- Nach Avidin-Biotin Rosettierung mit YTS 148.3.2.1
- Nach Komplementlyse mit YTS 148.3.2.1

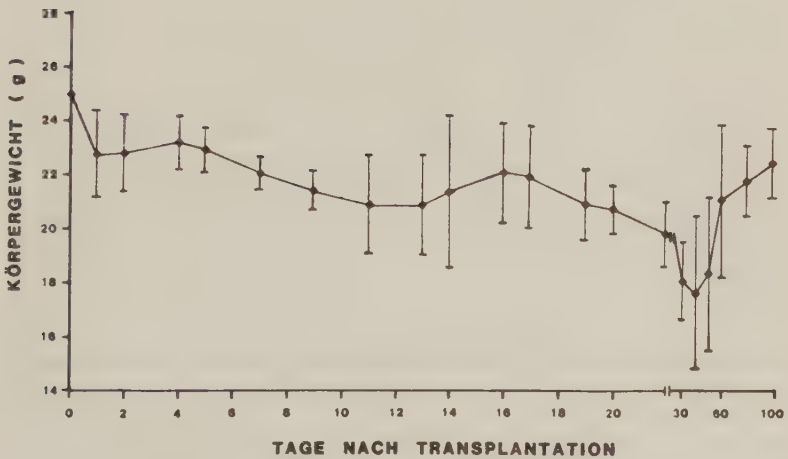


Abb. 19 Körpergewichtsverlauf nach T-Zell Depletion durch Komplementlyse mit YTS 148.3.2.1 im allogenen Milzmark-Transplantat (Mittelwerte $\pm$ s; n=6)

Die Milz eines am 18. Tag nach Transplantation getöteten Tieres zeigte im histologischen Schnitt eine hyperplastische rote Pulpa mit reger Hämpoese. Die weiße Pulpa war schmal und nur locker besiedelt. Es fanden sich einzelne Lyt 1.2 positive Zellen, aber auch Lyt 1.2 negative Lymphozyten. Das Bindegewebsgerüst war H2^k positiv. Die Lymphozyten waren H2^k negativ. Leber, Zunge und Herz zeigten eine nur geringe Infiltration mit Lymphozyten und Histiozyten. Im Gegensatz zur Avidin-Biotin Rosettierung, wo eine totale lymphatische Aplasie mit zum Teil gravierenden Schäden in der Bindegewebsstruktur auftrat, waren die Gewebeschäden nach Komplementlyse geringer und erste Ansätze einer lymphoiden Repopulation in der weißen Pulpa der Milz waren zu beobachten.

Gruppe F: Syngene Milzmark-Transplantation

Zur Kontrolle wurden insgesamt 10 Tiere mit syngenen Milzmark transplantiert. Bei 2 Transplantaten wurde eine T-Zell Depletion durch Avidin-Biotin Rosettierung vorgenommen.

Syngen transplantierte Tiere überlebten alle die 150 Tage Beobachtungszeit, ohne GvHD-typische, klinische Symptome. Dabei war kein Unterschied zwischen Transplantationen von CBA nach CBA und CBL nach CBL festzustellen. Der Chimärismus betrug 98% für beide Transplantationssysteme und wurde durch C-Bandenfärbung an Metaphasechromosomen des Knochenmarks nachgewiesen.

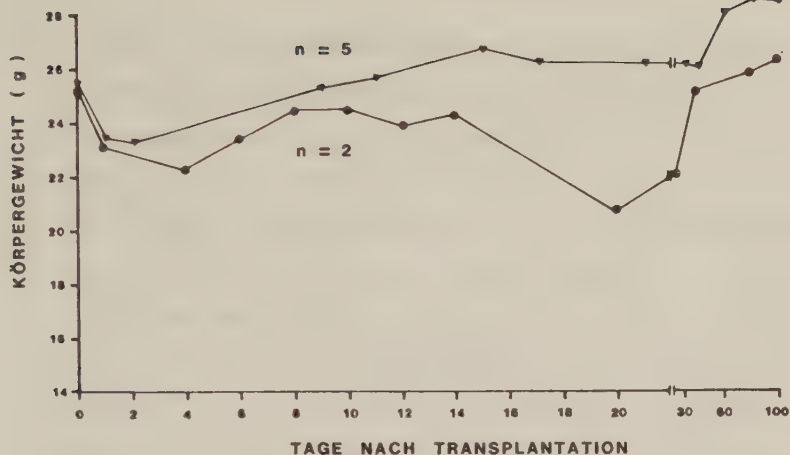


Abb. 20 Körpergewichtsverlauf nach syngener Milzmarktransplantation (CBL $\rightarrow$ CBL)
 ► syngen nicht depletiert
 ● syngen nach Avidin-Biotin Rosettierung mit YTS 148.3.2.1

Der Gewichtsverlauf (Abb.20) zeigte nach dem strahlungsbedingten Absinken am 2. Tag einen Anstieg, wobei am 10. bis 14. Tag beinahe das Ausgangsgewicht erreicht wurde. Dieses Gewicht wurde bis etwa zum 30. Tag gehalten oder nahm nur geringfügig ab. Erst zwischen dem 40. und 60. Tag nach Transplantation erfolgte eine nochmalige Gewichtszunahme, wobei das Ausgangsgewicht überschritten wurde. Diesen Verlauf zeigten auch 3 Kontrolltiere, bei denen das Milzmarktransplantat mit einem 13fachen Überschuß an Avidin-beladenen Erythrozyten den Dichtegradienten passiert hatte, ohne daß eine T-Zell Depletion durch einen biotinylierten Antikörper erfolgte. Einen anderen Gewichtsverlauf zeigten dagegen 2 syngen transplantierte Kontrollen, bei denen das

Transplantat durch Avidin-Biotin Rosettierung mit YTS 148.3.2.1 T-Zell depletiert war (Abb.20). Hier wurde am 10. Tag nach Transplantation zwar auch das Ausgangsgewicht nahezu erreicht, im Anschluß daran erfolgte aber ein ausgeprägtes Absinken des Körpergewichtes mit einem Minimum um den 21. Tag nach Transplantation. Erst ab dem 30. Tag erfolgte ein steiler Anstieg, wobei das Ausgangsgewicht erst nach dem 100. Tag überschritten wurde.

Im Blutbild von syngen transplantierten Tieren fanden sich 23 Tage nach Transplantation normale Werte für Erythrozyten und Monozyten. Lymphozyten waren noch vermindert, Granulozyten dagegen relativ vermehrt.

Gruppe G: Allogene Milzmark-Transplantation nach GvHD-Prophylaxe durch direkte T-Zell Rosettierung mit dem IgG2b-Antikörper RmT1

In zwei Versuchen erhielten insgesamt 14 Empfänger T-Zell-rosettierte allogene Milzmarkgemische. Zur direkten T-Zell Rosettierung wurden Glutaraldehyd-fixierte Erythrozyten verwendet, die nach der Pyridyldisulfid-Technik mit dem monoklonalen Antikörper RmT1 beladen waren. Dabei wurde eine T-Zell Depletion von 98% erreicht.

Die transplantierten Tiere überlebten alle länger als 150 Tage (Abb.21) ohne äußere Anzeichen einer Sekundärkrankheit. Die zytogenetische Untersuchung von 2 Tieren ergab, daß die Tiere nach 150 Tagen mit 98,5% Spenderzellmitosen in Milz und Knochenmark vollständige Chimären waren.

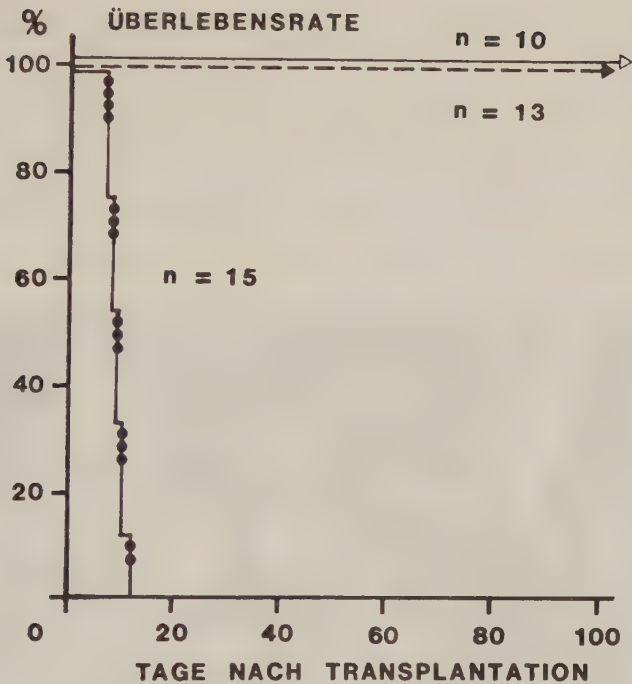


Abb. 21 100 Tage Mortalität nach unterschiedlicher Transplantatbehandlung in vitro.

- Unbehandelt
- > Nach direkter Rosettierung mit RmT1
- > Nach Komplementlyse mit RmT1

Nach 100 Tagen erhielten 5 der Versuchstiere jeweils ein Hauttransplantat vom Typ des ursprünglichen Milzmarkspenders (C57BL/6) und ein Hauttransplantat von einem dritten allogenen Spender (Balb/c). Während Balb/c-Haut innerhalb von 14 Tagen - bei einer Maus bis zum 19. Tag - abgestoßen

wurde, tolerierten die Chimären Transplantate vom CBL-Typ (Abb.22). Die CBL-Haut war am 21. Tag nach Hauttransplantation überall eingewachsen. Sie zeigte beginnenden Haarwuchs mit schwarzem CBL-Fell. Eine Abstoßung wurde innerhalb der Beobachtungsperiode von 50 Tagen nicht beobachtet.



Abb. 22 Hauttransplantation bei T-Zell rosettierten
CBL → CBA Langzeitchimären.

- a) Balb/c Haut ist nach 14 Tagen vollständig abgestoßen; die verbliebene Wunde heilt langsam ab.
- b) CBL Haut ist nach 14 Tagen glatt eingewachsen und wird spezifisch toleriert.

Zur zytogenetischen Untersuchung wurde ein Versuchstier am 13. Tag nach Milzmarktransplantation getötet. Es zeigte sich eine normale mitotische Aktivität mit 100% Spenderzellmitosen im Knochenmark. Der Mitoseindex betrug 3,6%. Die Milz des Tieres war vergrößert (Splenomegalie) und mit 149 mg überschwer. Der Thymus hatte nicht das atrophische Erscheinungsbild, wie es bei Tieren mit akuter oder chronischer GvHD auftritt und war mit 10,7 mg deutlich schwerer als die Thymi aller bisher beschriebenen allogenen transplantierten Versuchsgruppen.

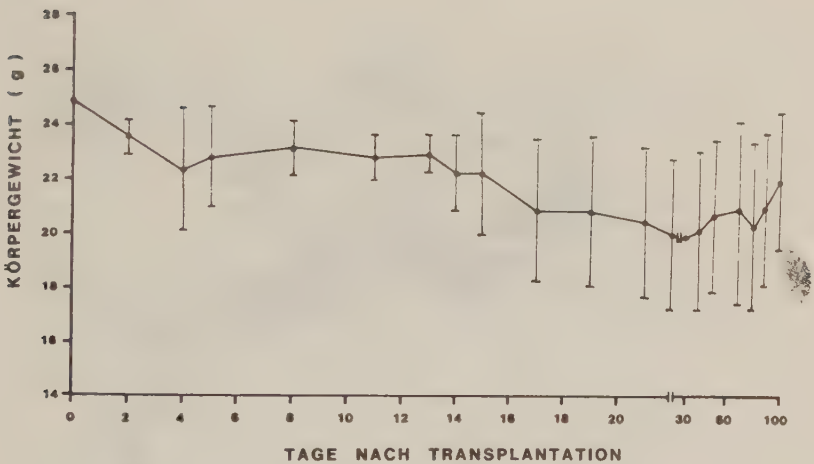


Abb. 23 Körpergewichtsverlauf nach direkter T-Zell Rosettierung mit RmTl im allogenen Milzmark-Transplantat (Mittelwerte $\pm$ s; n=5).

Der Verlauf der Körpergewichte (Abb.23) war ähnlich wie bei der syngen depletierten Versuchsgruppe, mit einer

weitgehenden Erholung am 10. bis 13. Tag nach Transplantation. Dann folgte eine langsame Gewichtsabnahme bis zum 30. Tag. Ab dem 30. Tag nach Transplantation nahmen die Körpergewichte wieder langsam zu, wobei das Ausgangsgewicht erst nach dem 100. Tag wieder erreicht wurde. Im histologischen Schnitt der Milz fand sich am Tag 100 nach Transplantation eine ausgewogene Repopulation mit T-Lymphozyten vom Spendertyp (Abb. 24a) und B-Lymphozyten ohne Anzeichen für eine GvHD. Die Wiederbesiedlung mit Lymphozyten war zu diesem Zeitpunkt aber immer noch weniger dicht als in einer normalen Kontrollmaus (Abb. 24b).



Abb. 24a

Darstellung der T-Zell Repopulation in der periarteriulären Zone der Milz nach direkter T-Zell Rosettierung mit RmT1 im allogenen Milzmark-Transplantat. Lyt-1.2⁺ Spender T-Lymphozyten wurden mit Hilfe einer indirekten Immunperoxidase-Technik dunkel angefärbt. Die weiße Pulpa zeigt im Bereich um die Zentralarteriole eine weitgehende Repopulation mit T-Zellen von Spendertyp (ca. 130x).

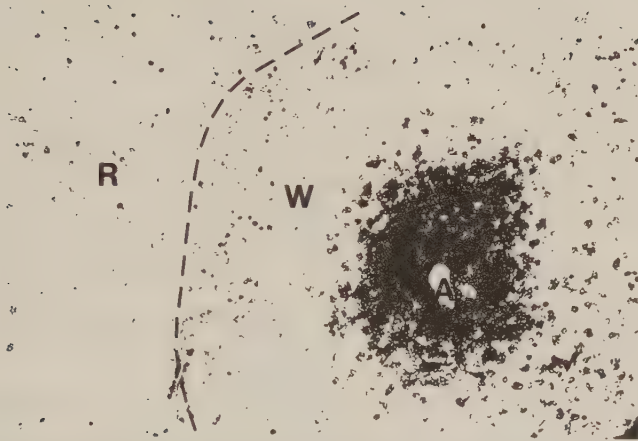


Abb. 24b

Periarterioläre Zone der Milz einer normalen Kontrollmaus. Die weiße Pulpa zeigt nach indirekter Immunperoxidase-markierung im Bereich um die Zentralarteriole eine dichte Besiedlung mit T-Lymphozyten (ca. 130x).

A= Zentralarteriole, W= Weiße Pulpa, R= Rote Pulpa,
-- = Verlauf der Grenze zwischen roter und weißer Pulpa.

Gruppe H: Allogene Milzmark-Transplantation nach
Komplement-vermittelter T-Zell Lyse mit
dem IgG2b-Antikörper RmT1

12 Empfänger erhielten allogene Milzmarktransplantate, welche vorher einer Komplement-vermittelten T-Zell-Lyse mit RmT1 unterworfen wurden. Der ursprüngliche, durch direkte Immunfluoreszenz ermittelte T-Zell Gehalt im Milzmark betrug 20%. Nach der Komplementlyse-Behandlung fanden sich 19,6% tote Zellen im Transplantat.

Die transplantierten Tiere zeigten keine klinischen Symptome einer GvH-Erkrankung und überlebten alle die Beobachtungszeit von 150 Tagen (Abb.21, Seite 103). Ein Tier wurde am 13. Tag nach Transplantation zur zytogenetischen Untersuchung getötet. Es ergab sich eine leicht erhöhte mitotische Aktivität mit einem Mitosindex von 5% im Knochenmark und 2,2% in der Milz. Von 100 Mitosen waren 99 vom Spenderotyp und eine vom Empfängertyp. Das Milzgewicht am 13. Tag nach Transplantation lag mit 92,3 mg wieder im Normalbereich. Der Thymus war bereits relativ schwer und zeigte mit 15,5 mg ein Gewicht, wie es sonst nur nach syngener Transplantation oder bei totaler Abwesenheit von GvH-Reaktionen am 13. Tag zu beobachten ist. Die Körpergewichte (Abb.25) nahmen nach dem strahlungsbedingten Gewichtsverlust der ersten 2 Tage zwischen dem 6. und 12. Tag zu und blieben dann lange Zeit auf diesem Niveau. Erst nach dem 40. Tag erfolgte eine weitere Gewichtszunahme, wobei die Ausgangswerte bereits zwischen dem 80. und 100. Tag nach Transplantation überschritten wurden.

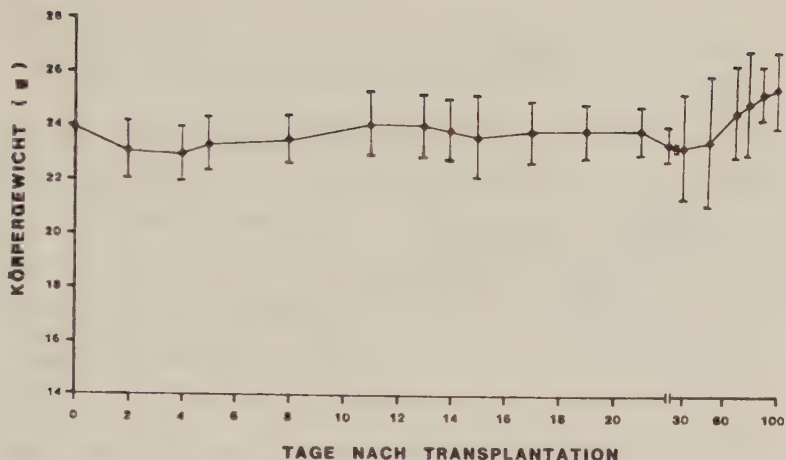


Abb. 25 Körpergewichtsverlauf nach T-Zell Depletion durch Komplementlyse mit RmT1 im allogenen Milzmarktransplantat (Mittelwerte $\pm$ s; n=6).

Am 100. Tag nach Transplantation erhielten 6 Mäuse der Versuchsgruppe Hauttransplantate.

Allogene Balb/c-Haut wurde bei allen Tieren innerhalb von 14 Tagen abgestoßen. Die zum Milzmarkspender syngenem CBL-Transplantate waren am 21. Tag nach Hauttransplantation fest eingewachsen und zeigten zunehmend Haarwuchs mit schwarzer Haarfarbe. Sie blieben bis zum Ende der Beobachtungszeit (50 Tage) stabil. Auch die zytogenetische Untersuchung zweier Tiere ergab, daß die Mäuse stabile und vollständige Chimären waren. 150 Tage nach Transplantation wurden im Mittel 98,5% Spenderzellmitosen im Knochenmark gefunden, was gut mit dem am 13. Tag ermittelten Wert übereinstimmt.

Gruppe I: Strahlenkontrolle

In 3 Kontrollversuchen wurden 16 Tiere untersucht, die nach der Ganzkörperbestrahlung mit 9 Gy keine Milzmark-Transplantation erhielten.

Die Tiere starben zwischen dem 8. und 20. Tag nach der Bestrahlung (Abb.26). Die 50% Mortalität wurde am Tag 15 erreicht.

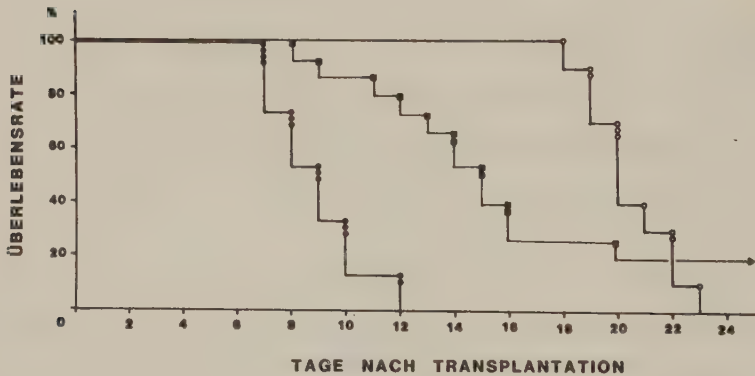


Abb. 26 Akute und verzögerte Mortalität allogener Milzmark-Empfänger im Vergleich zur Strahlenkontrolle

- unbehandelt transplantiert
- Strahlenkontrolle (nicht transplantiert)
- Transplantation nach Avidin-Biotin
- Rosettierung mit YTS 148.3.2.1

Die lymphatischen Organe zeigten eine ausgeprägte Atrophie. Das mittlere Milzgewicht von 7 untersuchten Tieren lag am Todestag mit $25,2 \pm 22$ mg klar unter dem von transplantierten Tieren. Die Thymi waren klein, wogen im Mittel $2,7 \pm 1,3$ mg und konnten bei einigen Tieren überhaupt nicht aufgefunden werden. Typisch für die Strahlenkontrolle war eine Panzytopenie. Kurz vor dem Tod waren die Blutausstriche nahezu leukozytenfrei und zeigten eine starke Verminderung der roten Blutzellen.

Die Anämie war bei einigen Tieren auch an einer hellbraunen Verfärbung von Leber und Nieren zu erkennen. Ein weiterer charakteristischer Unterschied zwischen Tieren, die an einer verzögerten, letalen GvHD leiden und der Strahlenkontrolle, zeigte sich am histologischen Schnitt der Milz. Dazu wurde ein am Tag 15 nach der Bestrahlung getötetes Tier untersucht. Während bei Tieren mit chronischer GvHD nur die weiße Pulpa zellfrei war, die rote Pulpa dagegen hyperplastisch, fand sich bei der Strahlenkontrolle neben der lymphatischen Atrophie der weißen Pulpa zusätzlich eine hämopoetische Atrophie mit stark verminderter Zellzahl in der roten Pulpa.

Eine strahlenbedingte Aplasie des Knochenmarks ließ sich zum Teil schon makroskopisch an der blassen, glasartig durchschimmernden Farbe der Markknochen erkennen. Die Gesamtzellzahl im Knochenmark war 10 Tage nach der Bestrahlung auf 1-3% des Normalwertes gesunken und bei der zytogenetischen Untersuchung fanden sich keine Mitosen in Milz und Knochenmark.

Die äußeren Symptome sowie der Gewichtsverlauf (Abb.27) der bestrahlten Tiere waren nicht geeignet um die Strahlenkrankheit von einer GvHD zu unterscheiden.

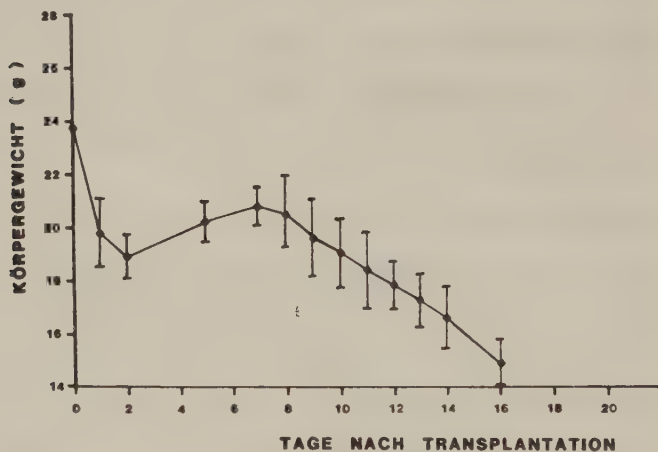


Abb. 27 Körpergewichtsverlauf der Strahlenkontrolle (Mittelwerte $\pm$ s; n=5). CBA Tiere, die nach der Bestrahlung mit 9 Gy keine Milzmarktransplantation erhielten, verloren nach ca. 8 Tagen stark an Gewicht und verstarben mit erlöschender Hämopoese.

Gruppe K: Direkte Rosettierung und Komplementlyse mit dem RmTl-Antikörper im reziproken CBA → CBL System.

Zur T-Zell Depletion im CBA Milzmarktransplantat wurde sowohl die direkte Rosettierung mit Pyridyldisulfid-gekoppelten, RmTl-beladenen Erythrozyten, als auch die Komplementlyse mit RmTl angewendet. In Parallelversuchen erhielten je 6 CBL Empfänger T-Zell depletiertes CBA Milzmarkgemisch. Als Kontrollen dienten unbehandelt transplantierte und nicht transplantierte (Strahlenkontrolle) Tiere.

Die transplantierten Tiere zeigten nach ca. 5 Tagen alle Symptome einer schweren GvHD und verstarben kurze Zeit später. Die mittlere Überlebenszeit nach Komplementlyse, sowie nach T-Zell Rosettierung betrug $7,3 \pm 0,8$ Tage. Die T-Zell depletierten Tiere überlebten damit nur unwesentlich länger als die unbehandelt transplantierte Kontrolle mit einer mittleren Überlebenszeit von $6,6 \pm 1,1$ Tagen. Die Milz und Thymusgewichte lagen nach T-Zell Depletion deutlich über denen der Strahlenkontrolle und unterschieden sich nur wenig von denen unbehandelt transplanzierter Tiere mit akuter GvHD.

Die Körpergewichte (Abb 28 u. 29) zeigten den für eine akute GvHD typischen einphasigen Verlauf ohne nochmalige Erholung.

Die zytogenetische Untersuchung von 3 Tieren der Komplementlysegruppe am Tag 5 nach Transplantation ergab im Mittel $98\% \pm 2\%$ Spenderzellmitosen im Knochenmark mit einer leicht erhöhten Mitoserate und spricht ebenfalls für eine akute GvHD als Todesursache.

Der RmTl-Antikörper ist somit im reziproken CBA $\rightarrow$ CBL System nicht in der Lage das Auftreten einer akuten GvHD zu verhindern, während er im normalen CBL $\rightarrow$ CBA System zu einer vollständigen Unterdrückung der GvHD fähig ist.

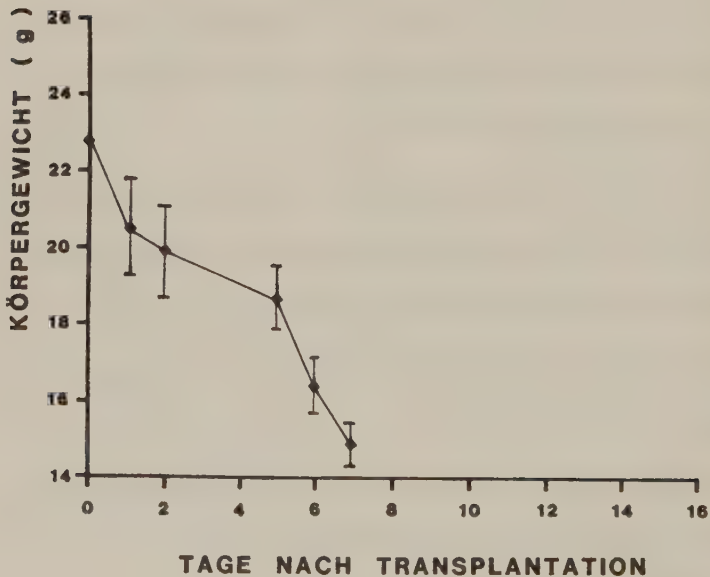


Abb. 28 Körpergewichtsverlauf nach direkter T-Zell Rosettierung mit RmTl im reziproken CBA $\rightarrow$ CBL System (Mittelwerte $\pm$ s; n=6).

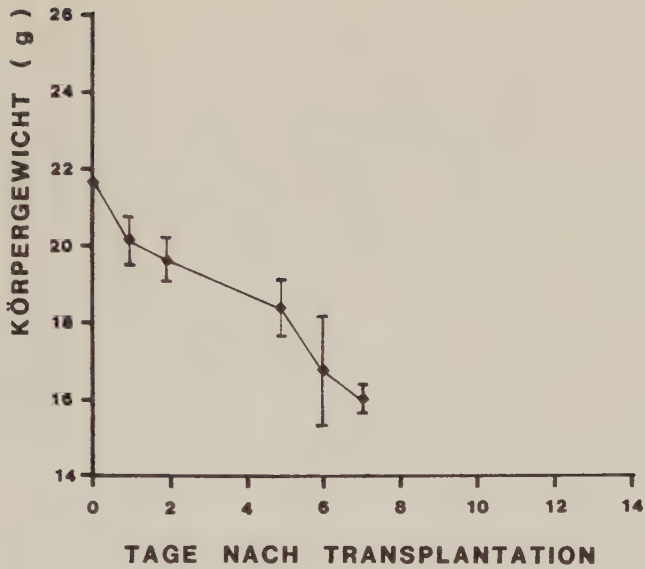


Abb. 29 Körpergewichtsverlauf nach Komplementlyse mit RmT1 im reziproken CBA → CBL System (Mittelwerte $\pm$ s; n=6).

IV. Diskussion

Es konnte gezeigt werden, daß T-Zell Rosettierung mit monoklonalen Antikörpern geeignet ist, im allogenen, stark inkompatiblen Mausmodell das Auftreten einer akuten GvHD zu verzögern oder sogar ganz zu verhindern. Bei der in vitro T-Zell Rosettierung von Milzmarktransplantaten zeigten die Empfänger im Mortalitätstest je nach Behandlungsmethode eine akute GvHD, eine verzögerte, letale Form der GvHD oder ein Langzeitüberleben ohne klinische Symptome mit der Ausprägung einer spezifischen Toleranz. Ein Nichtanwachsen des Transplantats oder eine verspätete Transplantatabstoßung, wie sie bei humaner Knochenmarktransplantation immer noch vorkommen, wurde nicht beobachtet. Zur Untersuchung von lokalen oder systemischen GvH-Reaktionen sind zahlreiche in vitro und in vivo Testsysteme bekannt (17). In seiner Aussagekraft für die Klinik ist der hier verwendete Mortalitätstest anderen Systemen überlegen, weil er neben der Aussage über die Stärke von GvH-Reaktionen auch ein dauerhaftes Anwachsen des Transplantats voraussetzt. Er zeigt nicht nur an, wie effektiv eine Methode zur Eliminierung von T-Zellen ist, sondern berücksichtigt auch wie schonend sie für die Stammzellpopulation ist. Da der Zeitpunkt der hämopoetischen Repopulation in Milz und Knochenmark von der Anzahl der transplantierten Stammzellen abhängt, kann er als indirektes Maß für eine

mögliche Stammzellbeeinträchtigung dienen. Nach Avidin-Biotin Rosettierung mit dem Ratten-IgM anti-Thy-1 Antikörper YTS 148.3.2.1 im Transplantat trat anstatt der akuten GVHD von unbehandelten Kontrollen eine letale, verzögerte Form der Sekundärkrankheit mit nochmaliger Erholung am 11. Tag nach Transplantation auf. Sie ist gekennzeichnet durch eine ausgeprägte lymphatische Atrophie und klinisch kaum von einer Transplantatabstoßung oder graft failure zu unterscheiden. Erst die histologische und zytogenetische Untersuchung lassen eine eindeutige Diagnose zu. Es sollte jedoch bemerkt werden, daß Histologie und zytogenetische Untersuchung nur Momentaufnahmen zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Transplantation darstellen. Die Tiere müssen dazu getötet werden und es läßt sich keine Aussage über den individuellen Krankheitsverlauf bzw. die Kinetik von degenerativen und regenerativen Prozessen machen. Die tägliche Körpergewichtsbestimmung bietet eine einfache Möglichkeit der kontinuierlichen Überwachung transplan- tierter Tiere. Wenn wir davon ausgehen, daß sich die Phasen der Zellkinetik im Gewichtsverlauf der Chimären widerspiegeln, dann sollte es möglich sein durch vorsich- tige Interpretation des Gewichtsverlaufs und Unterstützung durch histologische und zytogenetische Stichproben Rück- schlüsse auf die Zellkinetik und mögliche Reaktionsmecha- nismen zu ziehen, ohne die Tiere zu töten. Im Folgenden soll nun versucht werden, Ursachen und

mögliche Reaktionsmechanismen, die für den Tod oder das Überleben der Tiere verantwortlich sind aufzuzeigen.

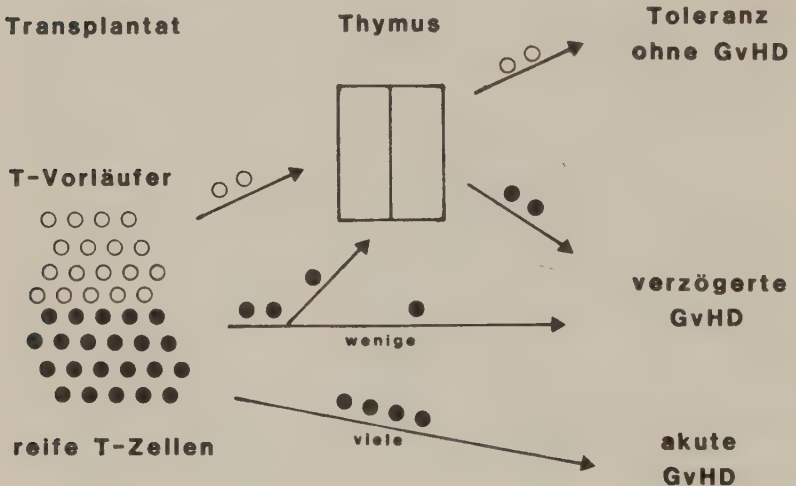


Abb. 30 Schematische Darstellung möglicher Reaktionsmechanismen nach van Bekkum (32).

Die akute Form der GvHD tritt bei Transplantation von unbehandelten oder suboptimal T-Zell depletierten Milzmarkgemischen auf. Sie wird allgemein auf das Vorhandensein reifer postthymischer T-Lymphozyten im Transplantat zurückgeführt, welche durch die Gewebsantigene des Empfängers laufend stimuliert werden. Eine 70% T-Zell Eliminierung (Versuch C) oder die Inkubation des Transplantats mit dem Ratten-IgM Antikörper YTS 148.3.2.1 ohne Komplement (Versuchsgruppe D) sind nicht ausreichend um den akuten Verlauf zu verhindern.

Je nach genetischer Verschiedenheit von Spender und Empfänger nehmen verschiedene Subpopulationen von T-Zellen an der GvHD teil. Suppressor T-Zellen vom $\text{Lyt } 2^+$ Phänotyp reagieren selektiv auf Unterschiede in Klasse I MHC Antigenen, während Helfer T-Zellen vom L3T4^+ Phänotyp bevorzugt auf Unterschiede in Klasse II MHC Antigenen reagieren (99). Da sich C57BL/6 Spender und CBA Empfänger sowohl in Klasse I und Klasse II MHC-Antigenen als auch in Minor-Histokompatibilitätsantigenen unterscheiden, ist damit zu rechnen, daß eine Vielzahl reaktiver Klone stimuliert wird, deren Abkömmlinge dann als zytotoxische Effektorzellen direkt die Empfängergewebe infiltrieren oder bei der Produktion von Zellmediatoren (17) und alloreaktiven Antikörpern (100) beteiligt sind. Die Tatsache, daß primär die lymphatischen Organe von den Effektormechanismen betroffen sind, hängt möglicherweise damit zusammen, daß aktivierte Lymphozyten in den lymphatischen Organen zurückgehalten werden (lymphocyte trapping) und so ihre Wirkung primär hier ausüben, bevor sie andere Organe infiltrieren. Nach dem Konzept von der Rezeptoroccupanz (101) wird die Stärke der T-Zell Stimulation von der Anzahl der besetzten T-Zell Rezeptoren bestimmt. Da die Histokompatibilitätsantigendichte in einem allogenen Empfänger als konstant hoch angesehen werden kann, hängt die Anzahl der besetzten T-Zell Rezeptoren in erster Linie von der Anzahl der transplantierten T-Zellen und von der Dichte der T-Zell Rezeptoren pro immunkompetenter T-Zelle ab. Die Immunkompetenz gegenüber Alloantigenen wird im Laufe

der Ontogenese im Thymus erworben. Deshalb können nur reife postthymische T-Zellen eine akute GvHD auslösen. Die Antigenerkennung ist spezifisch klonal und mit einer Erkennung von 'Selbst' MHC-Antigenen gekoppelt. Man spricht von einer MHC-Restriktion (102) der Antigenerkennung (siehe dazu auch Seite 126). Außerdem wird eine starke Stimulation bei hoher Rezeptordichte zu einer 'starken' Proliferation der stimulierten Klone führen. Diese starke Proliferation ist für die histologisch zu beobachtende Hyperplasie der Milz in den ersten Tagen nach Transplantation verantwortlich (103).

Der Proliferationsschub wird jedoch nach etwa 7 Tagen durch eine massive Immunsuppression beendet, wenn die proliferierenden Zellen zu immunsuppressiven Effektorzellen ausdifferenzieren. Histologisch überwiegen ab diesem Zeitpunkt die hypoplastischen Anzeichen, wie wir sie nach dem Tod der Tiere in der Milz beobachten. Während die kurze Proliferationsphase im Gewichtsverlauf der Tiere nur andeutungsweise zu erkennen ist, wirkt sich die terminale Suppressionsphase stark auf das Körpergewicht der Tiere aus.

Parkman (104) analysierte die bei einer akuten GvHD auftretenden Klone von Effektorzellen bei Minor Histokompatibilitätsdifferenzen. Er fand neben alloreaktiven Helfer-T-Zellen vom $L3T4^+$, $Lyt\ 2.2^-$ Phänotyp vor allem zytotoxische alloreaktive Suppressorzellen mit einem $Thy\ 1.2^+$, $Lyt\ 2.2^+$, $L3T4^-$ Phänotyp.

Rolink und Gleichmann (105) finden bei akuter GvHD im MHC differentiellen $P \rightarrow F_1$ System (siehe Seite 6) ebenfalls $\text{Lyt}1^+2^+$ Suppressorzellen vom Spendertyp, welche als Effektorzellen für die massive Immunsuppression nach dem 7. Tag nach Transplantation verantwortlich gemacht werden. Bei den von mir in den lymphatischen Organen gefundenen $\text{Lyt } 1.2^+$ Spenderzellen könnte es sich um derartige allo-reaktive Effektorzellen handeln. Woran die Tiere letztlich sterben ist nicht vollständig geklärt. Es besteht jedoch Einigkeit darüber, daß die zytotoxische GvH-Reaktion der Effektorzellen und die damit verbundene Immunsuppression den Ausschlag geben. Sepsis und die Infiltration mit polymorphkernigen Leukozyten, lymphoblastoiden Zellen und Zellen der Monozyten-Makrophagenreihe, könnten dann schließlich zu einem Tod durch Organversagen führen (106).

Von der verzögerten oder chronischen GvHD sind zwei Formen bekannt, die klinisch kaum zu unterscheiden sind: Einmal kann das Vorhandensein geringer Mengen von postthymischen T-Zellen im Transplantat ein verzögertes Auftreten und einen mildereren Verlauf der Krankheit verursachen. Heidt (107) mischte dem Knochenmarkstransplantat abnehmende Mengen an Milzzellen zu und erreichte so einen fließenden Übergang von einer akuten zu einer verzögerten Form der GvHD. Das Auftreten dieser Form der GvHD wäre, wie bei der akuten Form, nicht unbedingt vom Vorhandensein eines funktionstüchtigen Empfängerthymus abhängig. Transplantiert

man dagegen nur allogenes Knochenmark, so tritt eine Thymus-abhängige Form der chronischen GvHD auf, die nach van Bekkum bei thymektomierten Empfängern nicht beobachtet wird. Diese Thymusabhängigkeit erklären einige Autoren damit, daß die Effektorzellen, die eine verzögerte GvHD verursachen von prethymischen Vorläuferzellen des Spenders abstammen, die im Empfängerthymus ausreifen und dort allo-reaktiv geprägt werden (108,109). Andere Autoren glauben, daß durch eine bloße Störung der Thymusfunktion ein Reifestop von T-Zellen verursacht wird, so daß die Entwicklung normaler Immunfunktionen sowie von Toleranz unmöglich wird (110).

In meinen Versuchen tritt eine verzögerte Form der GvHD nach Avidin-Biotin Rosettierung mit dem Ratten-IgM anti-Thy-1 Antikörper YTS 148.3.2.1 und nach Komplementlyse mit diesem Antikörper auf (Versuchsgruppen B u. E). der grundlegende Unterschied zum akuten Verlauf nach suboptimaler Avidin-Biotin Rosettierung (Versuchsgruppe C) ist ein zweigipfelter Gewichtsverlauf mit einer nochmaligen Erholung um den 10. Tag nach Transplantation. Dieser Zeitpunkt der Erholung fällt nach eigenen Untersuchungen mit dem Zeitpunkt zusammen, wo bei syngener Transplantation oder völliger Abwesenheit einer GvHD die Repopulation von Thymus und Milz mit Lymphozyten beginnt. Es liegt also nahe das Auftreten der verzögerten GvHD mit einer Störung der normalen Regeneration des Lymphozyten-Pools in Verbindung zu bringen. Ein vorgeschädigter Thymus (110) könnte die normale Reifung der T-Zellen behindern und zu

einem Ausbleiben oder zu einem Ungleichgewicht von Immunfunktionen führen. Die niedrigen Thymusgewichte im Vergleich zu toleranten Tieren und die am Todestag fehlende oder nur ansatzweise vorhandene Wiederbesiedelung der weißen Pulpa der Milz bei Tieren mit verzögerter GvHD scheinen diese These zu belegen.

Die Deutung schließt jedoch nicht aus, daß die primären Ursachen von akuter und verzögerter GvHD die gleichen sind und in der Transplantation von postthymischen T-Zellen zu suchen sind. Im Gegenteil, wenn bei Milzmarktransplantation nach suboptimaler T-Zell Rosettierung eine akute Form der GvHD auftritt und nach einer 98% T-Zell Depletion mit dem selben Antikörper eine verzögerte GvHD auftritt, so ist anzunehmen, daß der Unterschied nur in der verminderten Anzahl der stimulierten T-Zell Klone besteht. Die geringere Organinfiltration mit mutmaßlichen Effektorzellen bei verzögerter GvHD spricht ebenfalls dafür, daß nur graduelle Unterschiede zwischen den beiden Erscheinungsformen bestehen.

Histologische Befunde und der zweigipfelige Gewichtsverlauf bei verzögerter GvHD deuten darauf hin, daß hier sowohl die frühen Reaktionen postthymischer T-Zellen als auch die sekundären Störungen der Lymphozytenentwicklung an der Pathogenese beteiligt sind. Die Frage des Überlebens wird aber wahrscheinlich in der frühen Induktionsphase der GvHD geregelt. Hier entscheidet sich wieviele T-Zell Klone aktiviert werden und ob die kurze zytotoxische Antwort der Effektorzellen stark genug ist, um Gewebeschäden im Thymus hervorzurufen. Nur wenn Schäden

mittleren Ausmaßes im Thymusgewebe, vor allem in der Medulla auftreten, ist damit zu rechnen, daß es zu Sekundärreaktionen kommt. Welche Effektorzellen an diesen Sekundärreaktionen beteiligt sind, ist nicht eindeutig geklärt. Es werden je nach Testsystem allo- und autoreaktive Helfer T-Zellen (104,105), alloreaktive zytotoxische Suppressorzellen (111), natürliche Killerzellen (110) und unspezifische Suppressorzellen (112) diskutiert. Das Aufeinanderfolgen von primären GvH-Schäden und sekundären Effektormechanismen bringt die Empfänger in einen immun-supprimierten Zustand mit einer ausgeprägten lymphatischen Atrophie. In diesem labilen Zustand zu dem auch Bestrahlung und T-Zell Depletion beitragen sind die Tiere praktisch nur durch ein funktionstüchtiges Makrophagensystem (113) geschützt. Auch geringfügige Infektionen z.B. aus dem eigenen Magen-Darmkanal können zum Tode der Tiere führen, wenn nicht eine rasche Regeneration postthymischer T-Zellen, die mit der Entwicklung von Immunkompetenz und spezifischer Toleranz einhergeht, den Zustand der Immunsuppression beenden.

Wie die Versuchsgruppen G und H zeigen ist ein Langzeitüberleben von Strahlenchimären nach allogener Milzmarktransplantation möglich, wenn das Transplantat in vitro entsprechend T-Zell depletiert wird. Das Langzeitüberleben ist unmittelbar mit der Ausbildung einer spezifischen Toleranz der Spenderzellen gegenüber den Gewebsantigenen des Empfängers verbunden. Diese spezifische Toleranz konnte sowohl nach direkter Rosettierung mit dem RmTl

Antikörper als auch nach Komplementlyse mit RmT1 nachgewiesen werden. Wie Billingham (114) bereits 1953 zeigte, müssen Immunität und spezifische Toleranz gegenüber Selbst- oder Fremdanthigenen im Laufe der Ontogenese "erlernt" werden. Man nimmt nun an, daß die Entwicklung eines funktionstüchtigen Immunsystems nach Transplantation hämopoetischer Stammzellen eine Rekapitulation der normalen Ontogenese darstellt. Das regenerierende Immunsystem vom Spendertyp "sieht" die Empfängerantigene über den Empfängerthymus als "Selbst" und produziert spezifische Suppressorzellen. Tutschka und Mitarbeiter (115,116) konnten bei Ratten zeigen, daß solche Antigen-spezifischen Suppressor T-Zellen die Reaktion von alloreaktiven Spenderzellen gegen den Empfänger hemmen und daß weder humorale Faktoren (117) noch eine klonale Deletion (118,119) für die Toleranz verantwortlich sind.

Die Toleranz muß durch Nachbildung von Suppressorzellen aktiv aufrecht erhalten werden und erfordert die Präsenz des Antigens (120). Die Abwesenheit von reifen T-Zellen im Transplantat verhindert die Entwicklung primärer GvH-Reaktionen, die den Empfängerthymus schädigen und begünstigt somit die rasche Entwicklung spezifischer Suppressorzellen.

Die hier beschriebene Hypothese eines aktiven peripheren Suppressormechanismus wird auch von anderen Autoren vertreten (121,122). Sie wird durch Ergebnisse aus der Klinik und aus Tiermodellen gestützt. Das Auftreten unspezifischer Suppressorzellen kann dabei als normale Entwicklungsstufe angesehen werden, die im Prozeß der

T-Zell Reifung einer Bildung spezifischer Suppressorzellen vorausgeht (116). Bei Patienten mit GvHD kann durch Störung der Thymusfunktion der Reifungsprozeß verzögert werden. Eine ungenügende Infektabwehr und ein Persistieren unspezifischer Suppressorzellen können die Folge sein. Die von mir beobachtete frühe Repopulation der Thymi und der lymphatischen Organe mit T-Lymphozyten bei Tieren ohne GvHD-Symptome ist mit dieser Hypothese vereinbar, obwohl bei Mäusen auch eine klonale Deletion als Mechanismus der Toleranzentstehung diskutiert wird. Es zeigt sich, daß Antigen-spezifische Toleranz und Langzeitüberleben nur bei Abwesenheit einer GvHD auftritt und daß dem Empfängerthymus bei der Ausbildung von Toleranz und der Entwicklung normaler Immunfunktionen eine entscheidende Bedeutung zukommt.

In diesem Zusammenhang ist die Frage nach der MHC-Restriktion von Immunreaktionen bei allogenen Chimären zu stellen. Aus zahlreichen Veröffentlichungen ist bekannt, daß bestimmte T-Zell Funktionen, z.B. die T-B Zell Kooperation bei der Antikörperbildung oder die zytotoxische T-Zell Reaktion gegen Virus-infizierte Zielzellen einer H-2 Restriktion unterliegen. Diese Funktionen können also nur ablaufen, wenn die beteiligten Partner MHC Identität aufweisen, d.h. sich gegenseitig als "Selbst", das beteiligte Antigen aber als "Fremd" erkennen. Bei CBL → CBA Chimären tragen alle T-Zellen sowie die Antigen-präsentierenden Zellen den CBL Haplotyp (H-2^b). Während ihrer Entwicklung im CBA Empfängerthymus erhalten sie aber eine vom

Thymusepithel ($H-2^k$ Haplotyp) abhängige Ausbildung mit $H-2^k$ Restriktionsspezifität. Da nun alle T-Zellen $H-2^k$ als Selbst erkennen, das Antigen aber nur in Verbindung mit $H-2^b$ präsentiert wird, müßten wichtige Immunfunktionen unterbleiben. Rodt und Thierfelder (123) konnten zeigen, daß allogene Chimären bei völliger Unterdrückung einer GvHD durchaus zu normalen Immunreaktionen fähig sind, die MHC-Restriktion also nicht absolut gilt oder umgangen werden kann. Auch meine Hauttransplantationsversuche deuten darauf hin, daß bei Abwesenheit einer GvHD normale Immunreaktionen gegen Hauttransplantate vom Balb/c-Typ möglich sind. Die Immunrekonstitution der Chimären war demnach bereits 100 Tage nach Transplantation abgeschlossen.

Interessant ist auch ein Vergleich der Körpergewichte nach syngener Transplantation mit und ohne T-Zell Rosettierung (Abb.20, Seite 101). Die syngen rosettierte Gruppe zeigt wie die allogenen mit RmT1 rosettierte Gruppe eine sekundäre Gewichtsabnahme nach dem 12. Tag. Diese Gewichtsabnahme findet sich nicht bei der syngenen, nicht depletierten Gruppe. Die Beobachtung deutet darauf hin, daß T-Zell Depletion auch in Abwesenheit einer GvHD zu einem vorübergehenden hypotrophen Zustand führt, in dem die Tiere infekgefährdet sind. Wenn wir davon ausgehen, daß die Gewichtskurven die Zellkinetik widerspiegeln, kann daraus geschlossen werden, daß die Abwesenheit postthymischer T-Zellen im Transplantat die normale Regeneration nach

einer Milzmarktransplantation verzögert oder umgekehrt die Anwesenheit postthymischer T-Zellen für eine rasche Regeneration erforderlich ist. Die günstige Wirkung reifer Zellen für die Regeneration ist auch vom humanen System bekannt, wo eine Gabe von buffy-coat Zellen das Anwachsen des Transplantats und die rasche Regeneration fördern (124).

Ein solcher trophischer Effekt reifer T-Zellen könnte zum Beispiel einfach darin bestehen, daß Ungleichgewichte im Immunsystem vermieden werden. Die reifen Zellen und deren Vorläufer könnten dann einen ausgeglichenen Immunstatus in der Zeit aufrecht erhalten, die verstreicht, bis sich neue immunkompetente Zellen aus den transplantierten Stammzellen entwickelt haben. Nach eigenen Untersuchungen ist die T-Zell Repopulation in den lymphatischen Organen ein langwieriger Prozeß, der frühestens nach 30 Tagen abgeschlossen ist. Das Wiedererlangen normaler Gehalte an reifen T-Zellen im peripheren Blut dauert noch länger. So kann die T-Zell Depletion an sich, unabhängig von der Anwesenheit einer GvHD, als eine der Ursachen für die sekundäre lymphatische Atrophie nach Knochenmarktransplantation und die damit verbundene Immunschwäche und Infektanfälligkeit angesehen werden.

T-Lymphozyten des CBL/J Stammes weisen gegenüber T-Lymphozyten des CBA/J Stammes eine höhere Thy-1 Antigendichte auf (Thierfelder, pers. Mitteilung), so daß bei normaler

CBL → CBA Transplantation die höhere Antigendichte auf der Seite des Spenders liegt. Ein Vergleich der Versuchsgruppen G und K zeigt, daß der RmT1 Antikörper im reziproken CBA → CBL System mit niedriger Antigendichte auf den Spenderzellen nicht in der Lage ist, das Auftreten einer akuten GvHD zu verhindern, während er im normalen CBL → CBA System mit hoher Antigendichte auf den Spenderzellen zu einer vollständigen Unterdrückung der GvHD fähig ist. Dieser Befund kann so gedeutet werden, daß bei niedriger Antigendichte auf den Spender T-Zellen weniger immunkompetente T-Zellen durch den Antikörper erkannt und eliminiert werden. Dies gilt sowohl für die T-Zell Rosettierung als auch für die Komplementlyse. T-Zellen mit sehr niedriger Antigendichte könnten dann auch bei der Bestimmung der T-Zell Depletion mit FITC-markierten anti Thy-1 Antikörpern unentdeckt bleiben und trotz scheinbar guter T-Zell Depletion eine akute GvHD hervorrufen. Sollte sich diese Deutung als richtig erweisen, dann kommt der Antigendichte auf immunkompetenten T-Zellen eine entscheidende Bedeutung zu, wenn es darum geht, GvH-Reaktionen zu verhindern.

Vergleicht man die indirekte Avidin-Biotin Rosettierung mit der direkten Rosettierung im Mortalitätstest, so fällt auf, daß die Milzmarkempfänger nach Avidin-Biotin Rosettierung mit dem Ratten-IgM-Antikörper YTS 148.3.2.1 alle an einer verzögerten GvHD verstarben, während die direkte Rosettierung mit dem Ratten-IgG2b-Antikörper RmT1 zu spezifisch toleranten Langzeitchimären führte. Da alle sonstigen Versuchsbedingungen unverändert gleich waren, kommen als Gründe für den fatalen Unterschied zwischen beiden

Versuchsgruppen nur das Transplantationssystem an sich oder die verwendeten monoklonalen Antikörper in Frage. Eine Toxizität Avidin-beladener Erythrozyten für den Empfänger kommt nicht in Betracht, da die Kontamination des Transplantats mit solchen Erythrozyten im syngenem System nicht zu einer Reduktion der Überlebensrate führt.

Außerdem sind die bei Avidin-Biotin-Rosettierung zum Tode führenden Gewebeschäden zum Teil GvHD spezifisch, so daß eigentlich nur eine ungenügende Entfernung postthymischer T-Zellen als Todesursache in Frage kommt.

Da bei indirekter Rosettierung nach der Antikörperinkubation Waschprozeduren erforderlich sind, könnte in dieser Zeit bereits gebundener biotinylierter Antikörper von der Zelloberfläche abdissoziieren oder durch aktive Prozesse von der Zelle aufgenommen (Endozytose) oder abgestoßen (capping u. shedding) werden. Eine Verminderung der möglichen Bindungsstellen wäre die Folge, und T-Zellen mit niedriger Antikörperbeladung könnten so der Depletion entgehen. Die Beobachtung, daß mit biotinyliertem Antikörper inkubierte und gewaschene T-Zellen nach der Waschprozedur weiteren direkt FITC-markierten Antikörper binden können, spricht für diese These. Ein "Capping" Phänomen wurde jedoch nicht beobachtet und ist beim Arbeiten unter Eiskühlung auch nicht zu erwarten.

Die Tatsache, daß die ermittelte T-Zell Depletion nach direkter und indirekter Rosettierung nicht wesentlich von einander abweicht, steht im Widerspruch zur Annahme einer unterschiedlichen T-Zell Depletion in vitro. Die Genauigkeit solcher Bestimmungen ist bei der geringen Anzahl

restlicher T-Zellen im Transplantat aber nicht ausreichend um geringe Unterschiede von weniger als 1% signifikant nachzuweisen. Nach Korngold (30) genügen bereits 0,3% reife T-Zellen um eine verzögerte letale GvHD auszulösen. Auch unterschiedliche Eigenschaften der verwendeten Antikörper könnten für das Langzeitüberleben einerseits oder eine verzögerte GvHD andererseits verantwortlich sein. Ein Vergleich der Mortalität nach Komplementlyse in den Versuchsgruppen E und H zeigt, daß in der mit YTS 148.3.2.1 (Ratten-IgM anti-Thy-1) behandelten Gruppe eine verzögerte GvHD auftritt, während die RmT1 behandelte Gruppe ohne GvHD-Symptome zu spezifisch toleranten Langzeitchimären wird. Beide Antikörper sind in vitro mit heterologem Komplement hoch zytotoxisch, erkennen das gleiche Antigen und inhibieren sich gegenseitig nahezu vollständig in ihrer Antigenbindung (Kummer, pers. Mitteilung). Thierfelder und Mitarbeiter (125) führen die unterschiedliche Wirkung auf eine unterschiedliche T-Zell Elimination durch die Antikörper in vivo zurück. Sie konnten zeigen, daß die immunsuppressive Wirkung eines Antikörpers in vivo von dessen Isotyp abhängt und mit dessen Affinität zur ersten Subkomponente der Komplementkaskade (C1q) korreliert. Sie unterscheiden in vivo immunsuppressive Antikörper mit hoher C1q-Affinität (z.B. RmT1) und in vivo kaum wirksame Antikörper mit niedriger C1q-Affinität (z.B. YTS 148.3.2.1). Als Hauptmechanismus für die T-Zell Elimination in vivo wird eine Opsonisation über Komplementrezeptoren gegenüber der Komplementlyse oder einem ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) Mechanismus

favorisiert. Während der RmTl also sowohl in vitro mit heterologem Komplement als auch in vivo mit Empfänger-eigenem Komplement zur T-Zell Eliminierung fähig ist, ist der Ratten-IgM anti-Thy-1 Antikörper YTS 148.3.2.1 zwar in vitro zytotoxisch, in vivo aber ohne heterologes Komplement nahezu unwirksam (siehe Versuchsgruppe D).

Für eine immunsuppressive Wirkung des RmTl in vivo nach der direkten Rosettierung in vitro müßte aber angenommen werden, daß nennenswerte Mengen des Antikörpers in die Milzmark-Empfänger gelangen. Obwohl die Transplantate mit Antikörper-beladenen Erythrozyten kontaminiert waren, ist diese Möglichkeit sehr unwahrscheinlich, da die eingebrachten Antikörpermengen auch bei vollständiger Freisetzung im Empfänger durch Enzyme oder andere Prozesse nicht ausreichen würden, um eine vollständige Immunsuppression zu bewirken.

Da über die physiologische Bedeutung des Theta Antigens und seine mögliche Beteiligung an GvH-Reaktionen wenig bekannt ist, könnten auch Unterschiede in der Feinspezifität der Antikörper für die beobachteten Unterschiede zwischen direkter und indirekter Rosettierung verantwortlich sein. Die immunsuppressive Wirkung eines Antikörpers wäre dann auf eine Epitop-spezifische Hemmung oder Stimulation Theta-abhängiger Funktionen zurückzuführen. Diese Möglichkeit ist deshalb attraktiv, weil sie eine immunsuppressive Wirkung des RmTl Antikörpers auch in gebundenem Zustand auf der Erythrozytenmembran in vitro zuläßt, ohne daß der unwahrscheinliche Transfer größerer Mengen freien Antikörpers in die Empfänger gefordert werden muß.

Andererseits könnten aber auch geringe, nicht meßbare Affinitätsunterschiede der beiden Antikörper zu einer unterschiedlichen T-Zell Depletion in vitro führen und damit die unterschiedliche Überlebensrate nach der Transplantatbehandlung mit RmT1 bzw. YTS 148.3.2.1 verursachen.

Ein direkter Vergleich der Komplementlysetechnik und der Rosettentechnik wurde im Mortalitätstest mit den beiden monoklonalen Antikörpern RmT1 und YTS 148.3.2.1 durchgeführt. Wie sich herausstellte, wird von beiden Techniken mit den gleichen monoklonalen Antikörpern ein ähnlicher Grad der GvHD-Unterdrückung erreicht. So läßt sich die GvHD beim Einsatz des RmT1 Antikörpers im normalen CBL → CBA System sowohl durch Komplementlyse als auch durch T-Zell Rosettierung erfolgreich unterdrücken. Mit YTS 148.3.2.1 dagegen erlauben beide Depletionstechniken nur eine Verzögerung der GvHD. Und im reziproken CBA → CBL System sind beide Techniken mit dem RmT1 Antikörper unwirksam.

Unter den beschriebenen Bedingungen wirkt sich somit die Depletionstechnik weniger auf die GvHD-Unterdrückung aus als die Eigenschaften des verwendeten Antikörpers und diese wiederum weniger als ein Transplantationssystem mit niedriger Thy-1 Antigendichte auf den Spenderlymphozyten. Bei der Komplementlyse können in vitro applizierte

Überschüsse an Antikörper und Komplement auch Empfänger T-Zellen in vivo erreichen. Die Beseitigung einer HvG-Restreaktivität könnte dann den geringfügig günstigeren Krankheitsverlauf (Abb. 18, Abb. 31) bei der Komplementlyse erklären.

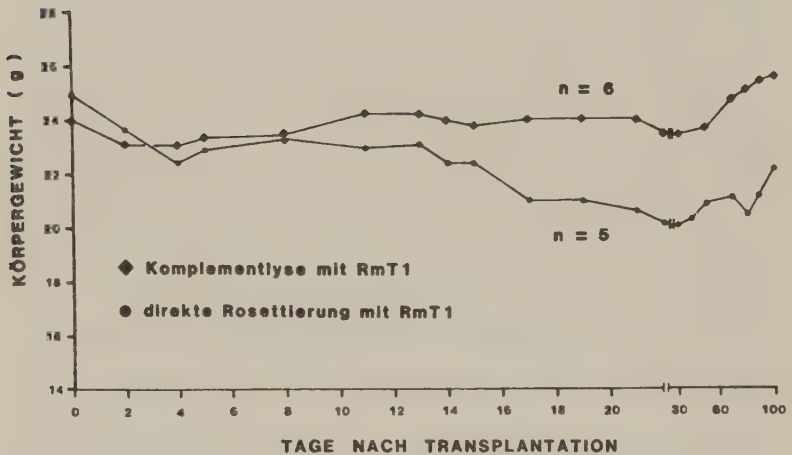


Abb. 31 Vergleich der Körpergewichtsverläufe nach Komplementlyse und nach direkter Rosettierung mit RmT1 bei allogener CBL → CBA Transplantation (Mittelwerte).

Weiter hat die Komplementlyse als Flüssigphase-Depletions-system gegenüber der Träger-gebundenen T-Zell Rosettierung den Vorteil, daß die Affinität des Antikörpers sowie

sterische Effekte der Erythrozyten keinen Einfluß auf die T-Zell Eliminierung haben. Andererseits ist die Komplementlyse nicht unabhängig von sterischen Faktoren, da die Komplementbindung (Clq) an die Fc-Teile der Antikörper nur bei einem bestimmten Abstand der Antikörper auf der Zelloberfläche zu stabilen Komplexen führt (127). Die Komplementlyse ist also wie die Rosettierung durch die Antigendichte auf der Zielzelle limitiert. Die Ergebnisse mit dem Ratten-IgM Antikörper YTS 148.3.2.1 (Abb.18, Seite 99) im CBL → CBA System zeigen, daß auch bei Zelldepletion über das in relativ hoher Dichte auf posttymischen Spenderzellen vorkommende Thy-1.2 Antigen der Maus, nicht jeder Antikörper geeignet ist, um eine GvHD in einem Depletionsschritt zu verhindern. Man geht heute davon aus, daß für eine erfolgreiche GvHD Unterdrückung bei allogener Knochenmarktransplantation eine T-Zell Depletion von mindestens 99% ($2 \log_{10}$ Stufen) erforderlich ist (126). Die von mir entwickelten Rosettentechniken liegen mit einer maximalen in vitro T-Zell Depletion von 98% knapp unter der 99% Marke, so daß das Auftreten einer GvHD im stark inkompatiblen System wahrscheinlich ist, wenn nicht eine zusätzliche Depletion durch weitere Depletionsschritte oder bestimmte Eigenschaften des Antikörpers hinzukommt. Auch andere Autoren kommen mit vergleichbaren Techniken bei Verwendung eines einzelnen monoklonalen Antikörpers, in einem Depletionsschritt kaum zu einer besseren T-Zell Elimination (55,60,128). Hier sind anscheinend die Grenzen

der Leistungsfähigkeit vieler monoklonaler Antikörper erreicht und eine wesentliche Steigerung der T-Zell Eliminierung durch weitere Optimierung der Technik ist nicht zu erwarten. Um dennoch zu einer besseren T-Zell Depletion zu kommen, werden zwei Strategien verfolgt: Einmal der synergistische Einsatz mehrerer Antikörper gegen das gleiche (127) oder verschiedene (68) T-Zell Antigene, zum anderen das Anhängen eines weiteren Depletionsschrittes (128,129, 130). Bei den Rosettentechniken ist die Durchführung eines zweiten Rosettierungsschrittes aber problematisch, weil bei der Dichtegradientenseparation hohe Zellverluste von bis zu 70% der eingesetzten Milzmarkzellen auftreten. Da in der klinischen Knochenmarktransplantation die Anzahl der Spenderzellen begrenzt ist, kann eine zu große, unspezifische Reduktion der Zellzahl zu Problemen der Ansiedlung der Spenderhämopoese oder zu einer Abstoßung des Transplantats führen, wenn zu wenig hämopoetische Stammzellen übertragen werden. Hier zeigt die Komplementlyse Vorteile gegenüber der Rosettierung, weil keine unspezifischen Zellverluste auftreten. Ein weiteres Argument gegen einen zweiten Rosettierungsschritt ist der damit verbundene enorme Arbeitsaufwand. Während bei der Komplementlyse leicht zwei Depletionsschritte an einem Vormittag durchführbar sind, lassen sich 2 Rosettierungsschritte im klinischen Maßstab praktisch kaum an einem regulären Arbeitstag bewältigen. Zur Steigerung der T-Zell Depletion von Rosettierungstechniken mit Dichtegradientenseparation bleibt also realistischlicherweise nur der synergistische

Einsatz mehrerer Antikörper. Die Avidin-Biotin Rosettierung ermöglicht im Gegensatz zur direkten Rosettierung den synergistischen Einsatz mehrerer Antikörper ohne störende Kreuzreaktionen mit Immunglobulin-tragenden Zellen, wie sie bei anderen indirekten Techniken (95) vorkommen. Die Frage, wie weit sich die T-Zell Depletion durch Avidin-Biotin Rosettierung mit einem Antikörper-Cocktail steigern läßt, übersteigt den Rahmen dieser Arbeit und kann erst in zukünftigen Versuchen geklärt werden. Ein Vorteil der Avidin-Biotin Rosettierung gegenüber der Komplementlyse besteht darin, daß hier nahezu jeder monoklonale anti-T-Zell Antikörper mit ausreichender Affinität und Spezifität verwendet werden kann, sofern er keine oder nur geringe Stammzelltoxizität besitzt. Bei Komplement-abhängigen Techniken müssen die Antikörper dagegen zusätzlich nach ihrer Komplementbindungsfähigkeit (Isotyp) und Feinspezifität (Synergistische Pärchen) ausgewählt werden, was eine aufwendige Screening-Prozedur bei der Herstellung erfordert. Probleme für die Komplementlyse können sich auch aus der mangelnden Standardisierbarkeit der heterologen Komplementquelle und den Absorptionsprozeduren ergeben, die zur Entfernung von Antikörperreaktionen gegen Stammzellen erforderlich sind. Alles in allem hat die Komplementlyse aber sowohl von der Theorie her, als auch von der Logistik her deutliche Vorteile gegenüber den Rosetten-techniken. Wenn jedoch synergistisch wirkende, komplementbindende Antikörper mit entsprechender T-Zell Spezifität

nicht zur Verfügung stehen, könnte die Avidin-Biotin Ro-
settierung trotz des höheren Arbeitsaufwandes durchaus
eine brauchbare Alternative zur Komplementlyse darstellen.

V. Ausblick

Die Unterdrückung der GvHD durch in vitro T-Zell Depletion
mit monoklonalen Antikörpern kann im Tiermodell wie be-
schrieben mit verschiedenen Techniken erreicht werden.
Entscheidend für den Erfolg ist also nicht die Technik,
sondern wahrscheinlich nur der Grad der T-Zell Depletion.
Das Problem der GvHD-Unterdrückung scheint zumindest bei
nicht malignen Krankheiten wie SCID (severe combined
immunodeficiency disease) durch möglichst vollständige
T-Zell Depletion lösbar zu sein. Im Gegensatz zum Maus-
modell bereitet im humanen System die Transplantatab-
stoßung nach T-Zell Depletion weitere Schwierigkeiten.
Sollte sich der in den Pilotstudien erhaltene Eindruck
bestätigen, daß die Antigendichte auf den Spender-T-Zellen
entscheidend ist für den Erfolg oder Mißerfolg einer GvHD-
Unterdrückung mit monoklonalen Antikörpern, dann müßten
sich zukünftige Anstrengungen darauf konzentrieren, die
immunkompetente T-Zelle und ihre Antigene immunologisch
genauer zu definieren. Es gilt, eine Reihe synergistisch
wirkender T-Zell spezifischer Antikörper zu entwickeln,
die zusammen als Antikörper-Cocktail möglichst alle
T-Zellen erkennen und so dicht besetzen, daß eine wirksame
T-Zell Depletion möglich wird.

D. ZUSAMMENFASSUNG

I. Es wurde ein direktes und ein indirektes (Avidin-Biotin) Rosettierungsverfahren zur Identifizierung und effektiven Abtrennung von T-Zellen aus heterogenen Zellgemischen mit Hilfe T-Zell-spezifischer monoklonaler Antikörper entwickelt. Verschiedene monoklonale anti-Thy-1 Antikörper wurden dazu aus Ascitesflüssigkeit gereinigt, in monovalente und divalente Antikörperfragmente gespalten, biotinyliert oder mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die gereinigten monoklonalen Antikörper wurden entweder direkt chemisch oder über eine Avidin-Biotin-Brücke an Schafer erythrozyten gebunden und mit der T-Zell-haltigen Probe rosettiert.

Zur Abtrennung der rosettierten Zellen von der nicht rosettierten Fraktion diente ein Percoll-Dichtegradient. Zur kovalenten Beladung von Glutaraldehyd-fixierten Schafer erythrozyten mit Antikörpern bzw. Avidin wurde erstmals die Pyridyldisulfid-Technik verwendet und mit herkömmlichen Proteinkopplungstechniken (Glutaraldehyd-Technik, Carbodiimid-Technik, Chromchlorid-Technik) verglichen. Zur Quantifizierung der Avidinbindung auf Schafer erythrozyten wurde Avidin radioaktiv mit Tritium markiert und ein Radioimmunoassay (RIA) etabliert.

Die Antigenbindungsfähigkeit verschiedener Antikörper wurde in einem indirekten RIA gemessen. Für biotinylierte Antikörper konnte mit ^3H -Avidin sowohl das Ausmaß der Biotinylierung als auch der Antigenbindungstiter bestimmt werden. Die Effektivität der Rosettierungstechniken wurde in quantitativen Rosettentests, Rosetten-Stabilitätstests und durch analytische Zellseparation mit künstlichen Thymozytengemischen getestet und optimiert, wobei direkte und indirekte Immunfluoreszenz als Vergleich dienten.

Dabei ergaben sich folgende Erkenntnisse:

- a)
 1. Die Dichte des auf die Erythrozytenmembran gebundenen Antikörpers bzw. Avidins ist entscheidend für die Sensitivität der Rosettierung, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Stabilität der gebildeten Rosetten.
 2. Die für eine stabile und sensitive Rosettierung erforderlichen hohen Moleküldichten auf der Erythrozytenoberfläche sind mit herkömmlichen Proteinkopplungsmethoden nur schwer zu erreichen, ohne daß die gekoppelten Moleküle ihre Bindungsfunktion verlieren oder eine spontane Agglutination der Erythrozyten auftritt.
 3. Die mehrstufige Pyridyldisulfid-Technik ist den getesteten herkömmlichen Einstufen-Kopplungsmethoden in ihrer Kopplungseffektivität deutlich überlegen, so daß die erforderlichen hohen Moleküldichten auf der Erythrozytenmembran leicht zu erreichen sind.
 4. Die Pyridyldisulfid-Kopplung ist gut reproduzierbar und läßt sich photometrisch quantifizieren.
 5. Die beladenen Erythrozyten zeigen keine Tendenz zur Aggregation und können wegen ihrer Glutaraldehyd-Fixierung monatelang in Azid-haltigem Medium aufbewahrt werden, ohne ihre Bindungsaktivität zu verlieren.
- b)
 1. Die indirekte Avidin-Biotin Rosettierung verbindet Vorzüge der direkten Rosettierung, wie hohe mechanische Stabilität der Rosetten und Vermeidung von Kreuzreaktionen mit Immunglobulin-tragenden Zellen, mit den Vorteilen indirekter Techniken, wie sparsamen Verbrauch von monoklonalen Antikörpern oder die Möglichkeit zum synergistischen Einsatz mehrerer biotinylierter Antikörper zur Zellseparation.
 2. Bei genügend hoher Avidin-Beladung der Erythrozyten konnten mit verschiedenen biotinylierten anti-Thy-1 Antikörpern zwischen 95% und 98% einer Thymozytenpopulation rosettiert werden.

3. Parallel durchgeführte Immunfluoreszenzbestimmungen markierten im Mittel $96 \% \pm 0,8 \%$ der Thymozyten.
 4. Die unspezifische Rosettierung mit unbiotinyliertem Antikörper oder biotinyliertem, nicht-bindenden Antikörper lag zwischen $0,5 \%$ und 7% .
 5. Die spezifische Rosettierung konnte durch Inkubation der Avidin-beladenen Erythrozyten mit d-Biotin gehemmt werden.
 6. Zur Abtrennung der rosettierten Fraktion erwies sich ein Percoll-Gradient mit einer Dichte zwischen $1,085 \text{ g/ml}$ und $1,087 \text{ g/ml}$ als zweckmäßig.
 7. Die T-Zell Depletion aus künstlichen Thymozyten-gemischen bei Avidin-Biotin Rosettierung betrug $97,1\% \pm 0,6\%$.
 8. Die T-Zell Depletion aus Milz-Knochenmarkgemischen betrug 94% bis 98% .
- c)
1. Die direkte Rosettierung mit Pyridyldisulfid-gekoppelten, Antikörper-beladenen Erythrozyten ergab bei genügend hoher Antikörperbeladung ebenfalls stabile Rosetten.
 2. Von einer Thymozytenpopulation konnten mit verschiedenen anti Thy-1 Antikörpern jeweils 93% rosettiert werden.
 3. Die parallel durchgeführte Immunfluoreszenzbestimmung markierte jeweils 95% bis 96% der Thymozyten.
 4. Die unspezifische Rosettierung mit Antigen-negativen Thymozyten lag je nach Antikörper zwischen 4% und 9% .
 5. Durch Rosettierung mit Antikörper-beladenen Erythrozyten konnte eine T-Zell Depletion von 98% bis 99% aus Milz-Knochenmarkgemischen erzielt werden.
 6. Die durch Rosettierung in einem Depletionsschritt erzielte T-Zell Depletion lag in einer Größenordnung, wie sie von anderen Autoren für vergleichbare Techniken angegeben wird.

II. In tierexperimentellen Pilotversuchen wurde untersucht, inwieweit durch eine in vitro T-Zell Depletion aus Knochenmarkstransplantaten der Maus, mit den entwickelten Rosettierungsverfahren, das Auftreten einer akuten Graft-versus-Host Reaktion beeinflusst werden kann.

Als Haupttestsystem für diese Fragestellung wurde der Mortalitätstest nach Übertragung eines allogenen CBL-Milz-Knochenmarkgemisches auf letal bestrahlte CBA-Empfängertiere gewählt.

Als Kontrollen dienten syngen transplantierte, unbehandelt transplantierte und nicht transplantierte (Strahlenkontrolle) Tiere.

Zur sicheren Beurteilung von Graft-versus-Host Reaktionen wurden neben der klinischen Beobachtung der Versuchstiere histopathologische Untersuchungen durchgeführt.

Der Spenderzellchimismus in transplantierten Tieren wurde immunhistologisch und zytogenetisch mit einer dafür entwickelten C-Bandenfärbung an Metaphasechromosomen nachgewiesen.

Die spezifische Toleranz von Spendergewebe sowie die Wiederherstellung der zellulären Immunantwort bei Langzeitchimären wurde durch Hauttransplantation nachgewiesen. Komplement vermittelte T-Zell-Lyse und T-Zell-Rosettierung wurden als Methoden zur T-Zell Depletion im Mortalitätstest direkt miteinander verglichen.

Bei den tierexperimentellen Untersuchungen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- a) 1. Während bei unbehandelt transplantierten Kontrollen und Versuchsgruppen mit suboptimaler T-Zell Depletion im CBL → CBA System eine akute GvHD (Sekundärkrankheit) auftrat, stellte sich nach Avidin-Biotin Rosettierung im Transplantat mit dem monoklonalen Ratten-IgM anti-Thy-1 Antikörper YTS 148.3.2.1 eine verzögerte, letale Form der GvHD ein.
2. Eine T-Zell Depletion im Transplantat durch Komplementlyse mit dem gleichen Antikörper im Parallelversuch führte ebenfalls zu einer verzögerten GvHD, wobei der Krankheitsverlauf weniger schwer war.

- b) 1. Nach T-Zell Entfernung im Transplantat durch direkte Rosettierung mit dem monoklonalen Ratten-IgG2b anti-Thy-1 Antikörper RmT1 wurde im CBL → CBA System ein Langzeitüberleben ohne klinische Krankheitssymptome beobachtet.
- Die Tiere waren vollständige Chimären. Sie tolerierten Hauttransplantate vom Typ des ursprünglichen Knochenmarkspenders, während Hauttransplantate von einem dritten Spender abgestoßen wurden.
2. Auch die T-Zell Depletion durch Komplementlyse führte mit dem RmT1-Antikörper zu spezifisch toleranten Langzeitchimären ohne GvHD-typische Krankheitssymptome.
- c) 1. Bei reziproker CBA → CBL Transplantation mit niedriger Thy-1 Antigendichte auf den Spenderlymphozyten konnte die T-Zell Entfernung durch direkte Rosettierung, mit den gleichen RmT1-beladenen Erythrozyten, eine akute GvHD nicht verhindern.
2. Nach T-Zell Entfernung durch Komplementlyse mit dem RmT1 Antikörper trat im reziproken CBA → CBL System ebenfalls eine akute GvHD auf.
3. Ein Nichtanwachsen des Transplantats oder eine verspätete Transplantatabstoßung wurde nie beobachtet.
- d) Daraus werden folgende Schlußfolgerungen abgeleitet:
1. T-Zell Rosettierung mit monoklonalen anti-Thy-1 Antikörpern ist grundsätzlich geeignet im stark inkompatiblen, 2-Haplotyp differenten Mausmodell das Auftreten einer akuten GvHD zu verzögern oder sogar ganz zu verhindern.
2. Ob eine GvHD auftritt und welchen klinischen Verlauf sie nimmt, hängt von der erreichten T-Zell Depletion ab. Diese wird beeinflußt von der Antigen-dichte (Thy-1) auf den Spenderlymphozyten, von den spezifischen Eigenschaften des verwendeten Antikörpers und von der Depletionstechnik und ihren Besonderheiten.

3. Komplementlyse und T-Zell Rosettierung sind bei optimaler Durchführung gleich wirksame Depletions-techniken. Im Mortalitätstest wird von beiden Techniken mit den gleichen monoklonalen Antikörpern ein ähnlicher Grad der GvHD-Unterdrückung erreicht.
4. Bei hoher Antigendichte (Thy-1) auf den Spenderlymphozyten sind bestimmte monoklonale anti-Thy-1 Antikörper (z.B. der Ratten-IgG2b Antikörper RmT1, nicht dagegen der Ratten-IgM Antikörper YTS 148.3.2.1) in der Lage, bei stark histoinkompatibler Transplantation eine vollständige Unterdrückung der GvHD mit einem Depletionsschritt zu erreichen.
5. Bei niedriger Antigendichte scheint dagegen das Anhängen weiterer Depletionsschritte sowie der Einsatz mehrerer synergistisch wirkender Antikörper gegen verschiedene T-Zell Antigene geboten, um eine wirkungsvolle Unterdrückung der GvHD zu erzielen. Die hier entwickelte Avidin-Biotin Rosettierung bietet dafür die Voraussetzungen.

E. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) O'Reilly R.J.
Current developments in marrow transplantation
Transpl. Proc. 19/1 (1987) 92
- 2) Owen R.D.
Immunogenetic consequences of vascular anastomosis between bovine twins.
Science 102 (1945) 400
- 3) Lorenz E., Uphoff D.E., Reid T.R., Shelton E.
Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections.
J. Nat. Cancer Inst. 12 (1951) 197
- 4) Barnes D.W.H., Loutit J.F.
Protective effects of implants of splenic tissue
Proc. Roy. Soc. Med. 46, No4 (1953) 251
- 5) Ford C.E., Hamerton J.R., Barnes D.W.H., Loutit J.F.
Cytological identification of radiation chimaeras
Nature 177 (1956) 452
- 6) Little C.C.
A possible mendelian explanation for a type of inheritance apparently non mendelian in nature
Science 40 (1914) 904
- 7) Little C.C.
The genetics of tumor transplantation. In: G.D. Snell (ed.)
Biology of the laboratory mouse.
Blakiston, Philadelphia (1941) 279-309
- 8) Barnes D.W.H., Loutit J.F.
Spleen protection: the cellular hypothesis. In: Radiobiology Symposium Liège 1954 (Z.M. Bacq ed.) London,
Butterworths (1955) 134
- 9) Trentin J.J.,
Mortality and skin transplantability in X-irradiated mice receiving isologous, homologous or heterologous bone marrow
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92 (1956) 688
- 10) Trentin J.J.
Induced tolerance and "homologous disease" in X-irradiated mice protected with homologous bone marrow
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96 (1957) 139

- 11) Klein J., Bach F.H., Festenstein F.
Genetic nomenclature for the H-2 complex of the mouse
Immunogenetics 1 (1974) 184
- 12) Behring Werke
Medizinische Information: HLA-System 2.Auflage, 1-90
- 13) Cohen J.A., Vos O., van Bekkum D.W.
The present status of radiation protection by chemical and biological agent in mammals. In: Advances in Radiobiology (eds. G.C.Heoesy, A.G. Forssberg and J.D.Abbatt) Edingburgh, Oliver & Boyd (1957) 134
- 14) van Bekkum D.W., Vos O.
Immunological aspects of homo- and heterologous bone marrow transplantation in irradiated animals
J. Cell. Comp. Physiol. 50 (1957) 139
- 15) Billingham R.E.
Reactions of grafts against their hosts
Science 130 (1959) 947
- 16) van Bekkum D.W., de Vries M.J.
Radiation Chimaeras
Logos Press, Academic Press, London (1967)
- 17) Grebe S.C., Streilein J.W.
Graft-versus-Host reactions: a review.
Advances in Immunology 22 (1976) 161-171
- 18) Koller P.C.
Discussion of Makinodan's paper
J. Cell. Comp. Physiol. 50 (1957) 345
- 19) Gowans J.L.
The fate of parental strain small lymphocytes in F₁ hybrid rats
Ann. New York Acad. Sci. 99 (1962) 432
- 20) Medawar P.B.
Introduction: Definition of the immunologically competent cell
Ciba Found. Study Group 16 (1963) 1
- 21) Dicke K.A., van Hooft J.I.M., van Bekkum D.W.
The selective elimination of immunologically competent cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures
Transplantation 6 (1968) 562

- 22) Rodt H., Thierfelder S., Eulitz M.
Suppression of acute secondary disease by heterologous anti-brain serum
Blut 25 (1972) 385
- 23) Tyan M.L.
Modification of severe Graft-versus-Host Disease with antisera to the Theta antigen or to whole serum
Transplantation 15, No 6 (1973) 601
- 24) Thierfelder S., Möller D., Kimura I., Dörmer P., Eulitz M., Mempel W.
Die Wirkung von heterologem Antilymphozytenserum auf die homologe und heterologe Knochenmarkübertragung bei supraletal bestrahlten Mäusen
Blut 25 (1967) 225
- 25) Field E., Gibbs J.
Crossreaction of anti lymphocyte serum with hemopoietic stem cells
Nature 217 (1968) 561
- 26) Reif A.E., Allen J.M.V.
The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues
J. Exp. Med. 120 (1964) 413
- 27) Raff M.C.
Theta Isoantigen as a marker of thymus-derived lymphocytes in mice
Nature 224 (1969) 378
- 28) Cantor H.
The effects of anti-Theta antiserum upon Graft-versus-Host activity of spleen and lymph node cells
Cell. Immunol. 3 (1972) 461
- 29) Köhler G., Milstein C.
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity
Nature 256 (1975) 495
- 30) Korngold R., Sprent J.
Letal Graft-versus-Host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice
J. Exp. Med. 148 (1978) 1687

- 31) Thierfelder S., Kummer U., Hoffmann-Fezer G., Schuh R.
Combined prophylactic suppression of graft-versus-host
and host-versus-graft reactions following treatment of
prospective bone marrow recipients with rat IgG 2b
anti-mouse T cell antibodies
Blut 52 (1986) 225
- 32) van Bekkum D.W., Löwenberg B.
Bone Marrow Transplantation
Marcel Dekker Inc., New York (1985)
- 33) Vriesendorp H.M., Wagemaker G., van Bekkum D.W.
Engraftment of allogeneic bone marrow
Transpl. Proc. 13 (1981) 643
- 34) Mathé G., Amiel J.L.
L'immunothérapie, nouvelle méthode de traitement des
leucémies
Nouv. Rev. Fr. Hematol. 4 (1964) 211
- 35) Weiden P.L., Sullivan K.M., Fluornoy N., Storb R., Thomas E.D.
and the Seattle marrow transplant team. Antileukemic
effect of chronic graft-versus-host disease. Contribution
to improved survival after allogeneic marrow transplantation
N. Engl. J. Med. 304 (1981) 1529
- 36) Halle-Pannenko O., Martyre M.C., Chauvanet M.
Prolongation of skin graft survival in mice by pretreatment
with H-2 antigen and cyclophosphamide
Europ. J. clin. biol. Res. 15 (1971) 1090
- 37) Vriesendorp H.M.
Engraftment of hemopoietic cells. In: Bone Marrow
Transplantation (eds. van Bekkum D.W. & Löwenberg B.),
Marcel Dekker Inc., New York (1985) 84 ff
- 38) Borel J.F., Feurer C., Gubler H.U., Stähelin H.
Biological effects of cyclosporin A : A new antilymphocytic
agent
Agents and Actions 6 (1976) 468
- 39) Klaus G.G.B.
The effects of cyclosporin A on the immune system
Immunology today 2 (1981) 83
- 40) Brent L.
Cyclosporin A: A discussion of its clinical and biological
attributes. Summary of a workshop
Transpl. Proc. 12 (1980) 233

- 41) van Bekkum D.W., Roodenburg J., Heidt P.J., van der Waaij
Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse
radiation chimaeras by modification of the intestinal
microflora
J. Nat. Cancer Inst. 52 (1974) 401
- 42) Slavin S., Reitz A., Bieber C., Kaplan H.S., Strober S.
Transplantation tolerance in adult rats using total
lymphoid irradiation. Permanent survival of skin,
heart and marrow allografts
J. Exp. Med. 147 (1978) 700
- 43) Norin A.J., Emeson E.E., Veith F.J.
Long-term survival of murine allogeneic bone marrow
chimaeras: effect of anti-lymphocyte serum and bone
marrow dose
J. Immunol. 126 (1981) 2
- 44) Rodt H., Kolb H.J., Netzel B., Haas R.J., Wilms K., Götze Ch.B.,
Link H., Thierfelder S. and the Munich cooperative group of
BMT.
Effect of anti-T-cell globulin on GvHD in leucemic patients
treated with BMT
Transpl. Proc. 13 (1981) 257
- 45) Cobbold S., Thierfelder S., Waldmann H.
Immunosuppression with monoclonal antibodies
Mol. Biol. Med. 1 (1983) 285
- 46) Thierfelder S., Cobbold S., Kummer U., Waldmann H., Schuh R.
Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation.
VII. Two out of nine monoclonal anti-Thy-1 antibodies
used for pretreatment of donor marrow suppressed graft-
versus-Host reaction without added complement
Exp. Hematol. 13/10 (1985) 948
- 47) Santos G.W.
Cyclosporin A in bone marrow transplantation - Baltimore
experience in preclinical studies. In Experimental
Hematology Today (S.J. Baum, G.D. Ledney & A. Kahn, eds.)
S. Karger, Basel (1981) 99
- 48) de Witte T., Raymakers R., Plas A., Koekman E., Wessels H.,
Haanen C.
Bone marrow repopulation capacity after transplantation
of lymphocyte-depleted allogeneic bone marrow using
counterflow centrifugation
Transplantation 37 (1984) 151

- 49) Dicke K.A., van Bekkum D.W.
Avoidance of akute secondary disease by purification of hematopoietic stem cells with density gradient centrifugation
Exp.Hematol. 20 (1970) 126
- 50) Dicke K.A., Schaefer K.W., van Bekkum D.W.
The use of stem cell concentrates as bone marrow grafts in man
Transpl. Proc. 5 (1973) 909
- 51) Filipovich A.H., Youle R.J., Neville D.M., Valleria D.A., Quinones R.R., Kersey J.H.
Ex-vivo treatment of donor bone marrow with anti-T-cell immunotoxins for prevention of graft-versus-host disease
Lancet 1 (1984) 469
- 52) Rodt H., Kolb H.J., Netzel B., Rieder I., Janka G., Belohradsky B., Haas R.J., Thierfelder S.
GvHD suppression by incubation of bone marrow grafts with anti-T-cell globulin: Effect in the canine model and application to clinical bone marrow transplantation
Transpl. Proc. 11 (1979) 962
- 53) Müller-Ruchholtz W., Wottge H.U., Müller-Hermelink H.K.
Modulation of immune reactions by antilymphocyte serum
Transpl. Proc. 10 (1978) 23
- 54) Kolb H.J., Rieder I., Rodt H., Netzel B., Grosse-Wilde H., Scholz S., Schäffer E., Kolb H., Thierfelder S.
Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VI. Graft-versus-host tolerance in DLA incompatible dogs after in vitro treatment of bone marrow with absorbed anti-thymocyte globulin
Transplantation 27 (1979) 242
- 55) Owen C.S., Sykes N.L.
Magnetic labeling and cell sorting
J. Immunol. Methods 73 (1984) 41
- 56) Reisner Y., Itzicovitch L., Meshorer A., Sharon N.
Hemopoietic stem cell transplantation using mouse bone marrow and spleen cells fractionated by lectins
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 2933
- 57) Reisner Y., Kapoor N., Pollack S., Friedrich W., Kirkpatrick D., Shank B., Csurny R., Pollack M.S., Dupont B., Good R.A., O'Reilly
Use of lectins in bone marrow transplantation. In: UCLA Symposia on molecular and cellular biology, Vol 7 (R.P. Gale ed.) Alan R. Liss, Inc. , New York (1983)

- 58) Reisner Y., Kapoor N., Kirkpatrick D., Pollack M.S.,
Cunningham-Rundles J., Dupont B., Hodes M.Z., Good R.A.
O'Reilly R.J.
Transplantation for severe combined immunodeficiency with
HLA-A,B,D,DR incompatible parental marrow cells fraction-
ated by soybean agglutination and sheep red blood cells
Blood 61 (1983) 391
- 59) Fong S.
Solid-Phase fractionation of lymphoid cells on ligand-
coated plastic plates. In: Cell separation, methods and
selected applications, Vol 2 (Pretlow T.G., Pretlow T.P. eds.)
Academic Press, London (1983) 203
- 60) Berenson R.J., Levitt L.J., Levi R., Miller R.A.
Cellular immunoabsorption using monoclonal antibodies
Transplantation 38 (1984) 136
- 61) Rembaum A., Yen R.C.K., Kempner D.H., Ugelstad J.
Cell labeling and magnetic separation by means of
immunoreagents based on polyacrolein microspheres
J. Immunol. Methods 52 (1982) 341
- 62) Treleaven J.G., Gibson F.M., Ugelstad J., Rembaum A.,
Philip T., Caine G.D., Kemshead J.T.
Removal of neuroblastoma cells from bone marrow with
monoclonal antibodies conjugated to magnetic microspheres
Lancet 1 (1984) 70
- 63) Coombs R.R.A., Wilson A.B.
Rosette-forming reactions. In: Clinical aspects of
immunology 4th edn., (P.J. Lachmann & H. Peters eds.)
Blackwell Scientific Publications, Oxford (1981) 343
- 64) Filipovich A.H., Vallera D.A., Youle R.J., Neville D.M.,
Kersey J.R. & J.H.
Ex-vivo T cell depletion with immunotoxins in allogeneic
bone marrow transplantation: The pilot clinical study
for prevention of GVHD
Transpl. Proc. 17/1 (1985) 442
- 65) Vallera D.A., Ash R.C., Zanjani E.D.
Anti-T-cell reagents for human bone marrow transplantation:
Ricin linked to three monoclonal antibodies
Science 222 (1983) 512
- 66) Rodt H.
Herstellung und Spezifität heterologer Anti-T-Lymphozyten-
Seren und ihre Anwendung im Rahmen der Knochenmarkstrans-
plantation und der Leukämiediagnostik
Habilitationsschrift, München 1978,
(GSF-Bericht H 604, März 1979) 1-236

- 67) Basch R.S., Berman J.W., Lakow E.
Cell separation using positive immunoselective techniques
J. Immunol. Methods 56 (1983) 269
- 68) Granger S., Janossy G., Francis G., Blacklock H., Poulter L.W., Hoffbrand A.V.
Elimination of T-lymphocytes from human bone marrow with monoclonal T-antibodies and cytolytic complement
Brit. J. Haematol. 50 (1982) 367
- 69) Carlsson J., Drevin H., Axén R.
Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation
Biochem. J. 173 (1978) 723
- 70) Green N.M.
Avidin
Adv. Protein Chem. 29 (1975) 85
- 71) Müller-Eberhard H.J.
A new supporting medium for preparative electrophoresis
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12 (1960) 33
- 72) Svendsen P.J.
A manual of quantitative immunoelectrophoresis
zitiert von B. Weeke
Scand. J. Immunol. Suppl. 1, 2 (1973) 15
- 73) Hudson L., Hay F.C.
Practical Immunology
Blackwell Scientific, Oxford (1980) 347
- 74) Heitzmann H., Richards F.M.
Use of the Avidin-Biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71 (1974) 3537
- 75) Ploem J.
The use of vertical illuminator with interchangeable dichroitic mirrors for fluorescence microscopy with incident light
Z. wiss. Mikr. 68 (1967) 129
- 76) Avrameas S., Taudou B., Chuilon S.
Glutaraldehyde, cyanuric chloride and tetraazotized o-dianisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test
Immunochemistry 6 (1969) 67

- 77) Goodfriend T.L., Levine L., Fassman G.D.
Antibodies to Bradykinin and Angiotensin: A use of Carbodiimides in Immunology
Science 144 (1964) 1344
- 78) Christen H.R.
Grundlagen der organischen Chemie
Sauerländer, Diesterweg, Salle, Frankfurt (1972) 808
- 79) Wilson A.B., Harris J.M., Waldmann H., Coombs R.R.A.
Direct antibody rosette-forming reactions using monoclonal markers of lymphocyte subpopulations
J. Immunol. Methods 92 (1986) 241
- 80) Goding J.W.
The chromic chloride method of coupling antigens to erythrocytes: Definition of some important parameters
J. Immunol. Methods 10 (1976) 61
- 81) Hardt H.-D.
Die periodischen Eigenschaften der chemischen Elemente
Thieme Verlag, Stuttgart (1974) 224
- 82) Parish C.R., Mc Kenzie J.F.C.
A sensitive rosetting method for detecting subpopulations of lymphocytes which react with alloantisera
J. Immunol. Methods 20 (1978) 173
- 83) Wood H.G., Barden R.E.
Biotin Enzymes
Ann. Rev. Biochem. 46 (1977) 385
- 84) Stuchbury T., Shipton M., Norris R., Malthouse J.P.G., Herbert J.A.L., Brocklehurst K., Suschitzky H.
A reporter group delivery system with both absolute and selective specificity for thiol groups and an improved fluorescent probe containing the 7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole moiety
Biochem. J. 151 (1975) 417
- 85) Unanue E.R., Ault K.A., Karnovsky M.J.
Ligand-induced movement of lymphocyte surface macromolecules. IV. Stimulation of cell motility by anti-Ig and lack of relationship to capping
J. Exp. Med. 139 (1974) 295

- 86) Richards F.M., Knowles J.R.
Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent
J. Mol. Biol. 37 (1968) 231
- 87) Mason D.W., Williams A.F.
The kinetics of antibody binding to membrane antigens
in solution and at the cell surface
Biochem. J. 187 (1980) 1
- 88) Broome J.D., Jeng M.W.
Promotion of replication in lymphoid cells by specific
thiols and disulfides in vitro
J. Exp. Med. 138 (1973) 574
- 89) Jocelyn P.C.
Biochemistry of the SH-group
Academic Press, London (1972) 55
- 90) Feucht H.E., Hadam M.R., Frank F., Riethmüller G.
Efficient separation of human T-lymphocytes from venous
blood using PVP-coated colloidal silica particles (PERCOLL)
J. Immunol. Methods 38 (1980)
- 91) Laemmli U.K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of
the head of bacteriophage T 4
Nature 227 (1970) 680
- 92) Uhlenbruck G., Seaman G.V.F., Coombs R.R.A.
Factors influencing the agglutinability of red cells
Vox Sang. 12 (1967) 420
- 93) Langone J.J.
Applications of immobilized protein A in
immunochemical techniques
J. Immunol. Methods 55 (1982) 277
- 94) Bright S., Munro A. J., Lawson Y.A., Coombs R.R.A.
The detection of alloantibodies to subpopulations of
human lymphocytes: An adaption of the indirect anti-
immunoglobulin rosetting reaction (IARR)
J. Immunol. Methods 24 (1978) 175
- 95) Ghetie V., Stalenheim G., Sjöquist J.
Cell separation by staphylococcal protein A -coated
erythrocytes
Scand. J. Immunol. 4 (1975) 471

- 96) Pellegrino M.A., Ferrone S., Dierich M.P., Reisfeld R.A.
Enhancement of sheep red blood cell human lymphocyte
rosette formation by the sulphydryl compound
2-aminoethylisothiuronium bromide
Immunol. Immunopathol. 3 (1975) 324
- 97) Hoffmann-Fezer G., Rodt H., Eulitz M., Thierfelder S.
Immunohistochemical identification of T- and B-lymphocytes
delineated by the unlabeled antibody enzyme method
J. Immunol. Meth. 13 (1976) 261
- 98) Ford C.E.,
The use of chromosome markers. In: Tissue grafting and
radiation (Micklem H.S., Loutit J.F. eds.)
Academic Press, London (1966) 197
- 99) Sprent J., Schaefer M., Lo D., Korngold R.
Properties of purified T cell subsets
J. Exp. Med. 163 (1986) 998
- 100) Cerottini J.-C., Nordin A.A., Brunner K.T.
Cellular and humoral response to transplantation antigens
J. Exp. Med. 134 (1971) 553
- 101) Hedrick S.M., Ashwell J.D., Matis L.A.
T cell activation as determined by receptor occupancy
In: Recognition and regulation in cell-mediated
immunity (J.D. Watson & J. Marbrook eds.)
Marcel Dekker, New York (1985) 149
- 102) Zinkernagel R.M., Callahan G.N., Althage A., Cooper S.,
Klein P.A., Klein J.
On the thymus in the differentiation of "H-2 self
recognition by T cells: Evidence for dual recognition?
J. Exp. Med. 147 (1978) 882
- 103) Benner R., Wolters E.A.J., Bril H., Molendijk A.,
van Oudenaren A.
Regulation of delayed type hypersensitivity to host
histocompatibility antigens during graft-versus-host
reactions
Immunol. Rev. 88 (1985) 25
- 104) Parkman R.
Clonal analysis of murine GvHD
J. Immunol. 136 (1986) 3543

- 105) Rolink A.G., Gleichmann E.
Allosuppressor- and allohelper-T cells in acute
and chronic GvHD
J. Exp. Med. 158 (1983) 546
- 106) Rappaport H., Khalil A., Halle-Pannenko O., Pritchard L.,
Dantchev D., Mathé G.
Histopathologic sequence of events in adult mice
undergoing letal graft-versus-host reaction developed
across H-2 and/or non H-2 histocompatibility barriers
Amer. J. Pathol. 96 (1979) 121
- 107) Heidt P.J., Wagemaker G., Knaan-Shanzer S., van Bekkum D.W.
Two distinct types of late onset GvHD after bone marrow
transplantation in lethally irradiated mice
Transplantation 32 (1981) 263
- 108) Mc Gregor D.D.
Bone marrow origin of immunologically competent
lymphocytes in the rat
J. Exp. Med. 127 (1968) 953
- 109) Müller-Ruchholtz W., Wottge H.-U., Müller-Hermelink H.K.
Restitution potentials of allogeneically or xenogeneically
grafted lymphocyte-free hemopoietic stem cells
In: Immunobiology of bone marrow transplantation
(Thierfelder, Rodt, Kolb eds.) Springer Verlag
Berlin (1980) 153
- 110) Lapp W.S., Ghayur T., Mendes M., Seddik M., Seamayer T.A.
The functional and histological basis for graft-versus-
host induced immunosuppression
Immunol. Rev. 88 (1985) 107
- 111) Tsoi M.S.
Immunological mechanisms of GvHD in man
Transplantation 33 (1982) 459
- 112) Tutschka P.J., Teasdall R., Beschorner W.E., Santos G.W.
Chronic GvHD in the rat radiation chimera
II. Immunological evaluation in long-term chimeras
Transplantation 34 (1982) 289
- 113) Anthony L.S.D., Stevenson M.M., Lapp W.S., Kongshavn P.A.L.
Macrophage activity in mice undergoing chronic graft-
versus-host reactions
Transplantation 38 (1984) 536

- 114) Billingham R.E., Brent L., Medawar P.B.
"Actively acquired tolerance" of foreign cells
Nature 172 (1953) 603
- 115) Tutschka P.J., Hess A.D., Beschorner W.E., Santos G.W.
Suppressor cells in transplantation tolerance
I. Suppressor cells in the mechanism of tolerance
in radiation chimeras
Transplantation 32 (1981) 203
- 116) Tutschka P.J., Ki P.F., Beschorner W.E., Hess A.D., Santos G.W.
Suppressor cells in transplantation tolerance
II. Maturation of suppressor cells in the bone marrow chimera
Transplantation 32, (1981) 321
- 117) Hellström I., Hellström K.E., Storb R., Thomas E.D.
Colony inhibition of fibroblasts from chimeric dogs.
Mediated by the dogs' own lymphocytes and specifically
abrogated by their serum
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66 (1970) 65
- 118) Nossal G.J.
Lymphocyte differentiation and the concept of clonal
abortion in tolerance induction
In: Regulation of growth and differentiated function
in eukaryote cells (Talwar G.P. ed.)
Raven Press, New York (1975) 235
- 119) Atkinson K., Storb R., Weiden P.L., Deeg H.J.,
Gerhard-Miller L., Thomas E.D.
In vitro tests correlating with presence or absence of
GvHD in DLA nonidentical canine radiation chimeras:
Evidence that clonal abortion maintains stable graft-
host tolerance
J. Immunol. 124 (1980) 1808
- 120) Tutschka P.J., Hess A.D., Beschorner W.E., Santos G.W.
Suppressor cells in transplantation tolerance
III. The role of antigen in the maintenance of
transplantation tolerance
Transplantation 33 (1982) 510
- 121) Deeg H.J., Tsoi M.S., Storb R.
Mechanisms of tolerance in marrow transplantation
Transpl. Proc. 16 (1984) 933
- 122) Santos G.W., Hess A.D., Vogelsang G.B.
Graft-versus-host reactions and disease
Immunol. Rev. 88 (1985) 169

- 123) Rodt H., Thierfelder S., Hoffmann-Fezer G.
Influence of the recipient thymus on the maturation of T-lymphocytes in H-2 different radiation chimeras
In: Immunobiology of bone marrow transplantation
(Thierfelder, Rodt, Kolb eds.) Springer Verlag
Berlin (1980) 179
- 124) Storb R.
Decrease in the graft rejection rate and improvement in survival after marrow transplantation for severe aplastic anemia
Transpl. Proc. 11 (1979) 196
- 125) Thierfelder S., Kummer U., Schuh R., Mysliwietz J.
Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation VIII. Recipient conditioning with C1q-affine monoclonal anti-pan T antibodies prevents GVHD in homozygous fully mismatched mice
Blood 68,4 (1986) 818
- 126) Hagenbeek A., Wagemaker G., van Bekkum D.W., Sizoo W., Sintnicolaas K., Löwenberg B.
One log versus two log T-cell depletion from HLA-identical marrow grafts in relation with the incidence of GVHD
Exp. Hematol. 14,6 (1986) 448
- 127) Hughes-Jones N.C., Gorick B.D., Miller N.G.A., Howard J.C.
IgG pair formation on one antigenic molecule is the main mechanism of synergy between antibodies in complement-mediated lysis
Eur. J. Immunol. 14 (1984) 974
- 128) Reynolds C.P., Black A.T., Saur J.W., Seeger R.C., Ugelstad J., Woody J.N.
An immunomagnetic flow system for selective depletion of cell populations from marrow
Transpl. Proc. 17/1 (1985) 434
- 129) Siena S., Villa S., Bonadonna G., Bregni M., Gianni A.M.
Ex-vivo depletion of human bone marrow T lymphocytes by soybean lectin fractionation followed by treatment with an anti-pan-T cell (CD5) ricin A⁻ chain immunotoxin
Transpl. Proc. 14/1 (1987) 2735
- 130) O'Reilly R.J., Collins N.H., Kernan N., Brochstein J., Dinsmore R., Kirkpatrick D., Siena S., Keever C., Jordan B., Shank B., Wolf L., Dupont B., Reisner Y.
Transplantation of marrow-depleted T cells by soybean lectin agglutination and E-rosette depletion: Major histocompatibility complex-related graft resistance in leukemic transplant recipients
Transpl. Proc. 17/1 (1985) 455

F. DANKSAGUNG

Mein persönlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. S. Thierfelder für die Möglichkeit, in dem von ihm geleiteten Institut für Immunologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH., diese Dissertationsarbeit durchführen zu können. Er ließ mir bei der Planung und Durchführung der Untersuchungen völlige Entscheidungsfreiheit und förderte deren Fortgang durch wertvolle Anregungen.

Herrn Prof. Dr. F. Schwarzfischer gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit an der Hochschule und für seine wissenschaftliche Anteilnahme am Ablauf der Untersuchungen.

Für die Anfertigung der histologischen Schnitte, und die freundliche Unterstützung bei der Interpretation der immunhistologischen Befunde möchte ich Frau Dr. G. Hoffmann-Fezer ganz besonders danken. Ohne ihre Hilfe wäre eine exakte Diagnose der unterschiedlichen GvHD-Syndrome kaum möglich gewesen.

Herrn Dr. J. Wienberg und Frau Heidi Lieb vom Institut für Anthropologie und Humangenetik, bin ich zu Dank verpflichtet, für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der Entwicklung einer C-Bandenfärbung zum zytogenetischen Nachweis des Spenderzellchimärismus in transplantierten Mäusen.

Die Herren Prof. Dr. M. Eulitz, Dr. U. Kummer und J. Mysliwietz halfen mir bei der Einarbeitung in verschiedene immunologische Arbeitstechniken und standen stets für stimulierende Diskussionen zur Verfügung.

Zuletzt möchte ich mich noch bei den Damen Barbara Glöckner, Julika Jasny und Ulla Meincken für ihre ausgezeichnete technische Hilfestellung bedanken. Ohne ihre aktive Unterstützung wären insbesondere die aufwendigen Transplantationsversuche kaum möglich gewesen.

G. PERSÖNLICHE DATEN

Ich wurde am 13.12.1950 in München als Sohn des Schreinermeisters Anton Fürfang und seiner Ehefrau Anna, geb. Kraus, geboren und römisch katholisch getauft. Meine frühe Jugend verbrachte ich mit meinen Eltern in 8193 Ambach. Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule in Holzhausen. 1961 zogen wir nach München, wo ich nach bestandener Aufnahmeprüfung ins mathematisch-naturwissenschaftliche Klenze-Gymnasium eintrat. Dort legte ich im Juni 1970 die Reifeprüfung ab. Von 1970 bis 1971 leistete ich in der Maxhofkaserne in Starnberg meinen Wehrdienst ab.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München die Fächer Biologie und Chemie zu studieren und legte dort am 13.12.1976 das Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien ab.

Von 1977 bis 1980 war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter von Prof. Dr. O. Siebeck am Zoologischen Institut der Universität München an einem Forschungsauftrag des Bayerischen Staatsministeriums für Landesentwicklung und Umweltfragen beteiligt.

Seit 1982 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter von Prof. Dr. S. Thierfelder am Institut für Immunologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung tätig, wo ich die Gelegenheit erhielt mich auf die Promotion vorzubereiten. Ich bin seit 1985 Mitglied des Sonderforschungsbereiches SFB 217 der Universität und arbeite dort an Problemen der experimentellen Knochenmarktransplantation und der kovalenten Proteinkopplung.

(Julius Fürfang)

